

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291125 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.13

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

(22) Дата подачи заявки
2020.10.15

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/915,186

(32) 2019.10.15

(33) US

(86) PCT/EP2020/079017

(87) WO 2021/074286 2021.04.22

(88) 2021.06.24

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

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., 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 предусмотрены выделенные мутантные полипептиды гемагглютинаина вируса гриппа, способы получения выделенных мутантных полипептидов гемагглютинаина, композиции, содержащие их, вакцины, содержащие их, и способы их применения, в частности при выявлении, предупреждении и/или лечении гриппа.

A1

202291125

202291125

A1

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5 ЗАЯВЛЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ФИНАНСИРУЕМОГО ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее изобретение было создано, по меньшей мере частично, при
государственной поддержке в соответствии с соглашением HNSO10020170018C,
выданным HNS. Правительство обладает определенными правами на настоящее
10 изобретение.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области медицины. В данном документе
предусмотрены выделенные полипептиды гемагглютинина вируса гриппа, способы
15 получения полипептидов гемагглютинина, композиции, содержащие их, вакцины,
содержащие их, и способы их применения, в частности, при выявлении,
предупреждении и/или лечении гриппа.

20 ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в
электронном виде с помощью EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате
ASCII с названием файла "688097.562US Sequence Lisitng" и датой создания 16
сентября 2019 г., и имеющего размер 468 Кб. Перечень последовательностей,
25 представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и включен в данный
документ посредством ссылки в его полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вирусы гриппа А и В являются основными патогенами человека, вызывающими
30 респираторное заболевание (обычно называемое "инфлюэнцей" или "гриппом"),
тяжесть которого варьирует в пределах от субклинической инфекции до первичной
вирусной пневмонии, которая может привести к летальному исходу. По оценкам ВОЗ
ежегодные эпидемии гриппа приводят в результате к ~1 миллиарду инфекций, 3–5
миллионам случаев тяжелого заболевания и 300000–500000 случаев смерти. Тяжесть

пандемического гриппа зависит от многих факторов, в том числе от вирулентности пандемического штамма вируса и уровня уже имеющегося иммунитета. Самая тяжелая пандемия гриппа в 1918 году привела в результате к > 40 миллионов случаев смерти во всем мире. Вакцины против вируса гриппа разрабатываются каждый год, чтобы

5 соответствовать циркулирующим штаммам, поскольку они эволюционируют антигенно вследствие антигенного дрейфа. Тем не менее, эффективность вакцины не является оптимальной и очень низка в случае антигенного несоответствия между вакциной и циркулирующим штаммом вируса. Противовирусные средства, нацеленные на фермент

10 вируса гриппа нейраминидазу, были разработаны для профилактики и терапии. Однако применение этих противовирусных препаратов все еще ограничено. Новые подходы к борьбе с гриппом включают разработку универсальных вакцин против вируса гриппа, которые обеспечивают защиту от антигенно отдаленных вирусов гриппа (Krammer et al., Nat. Rev. Disease Primers 4:3 (2018)).

В течение последних трех десятилетий две различные линии вируса гриппа В

15 совместно циркулировали в популяции в разной степени каждый сезон, и оказалось трудно предсказать доминирующую линию В в конкретном сезоне, что усложняет принятие решения о том, какую линию следует включить в трехвалентную вакцину (TIV) (Ambrose et al., Hum. Vaccin. Immunother. 8:81-8 (2012); Центры США по контролю и профилактике заболеваний, "Отчеты о наблюдении за сезонной

20 активностью гриппа за 2001–2018 гг.", www.cdc.gov/flu/weekly/pastreports.htm (по состоянию на 2 июля 2018 г.); Европейский центр профилактики и контроля заболеваний/Европейское региональное бюро ВОЗ, "Ежегодные эпидемиологические отчеты о сезонном гриппе за 2001–2018 гг.", ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/aer (доступ на 2 июля 2018 г.)). Важность

25 эффективного охвата вакцинацией против вируса гриппа В демонстрируется ее вкладом в общую заболеваемость сезонным гриппом. Согласно данным Центров по контролю за заболеваниями США и отчетам из нескольких европейских стран, грипп В был причиной 0,8-82% всех лабораторно подтвержденных случаев гриппа в период с 2001 по 2018 год при среднем сезонном уровне 25% (Ambrose et al., Hum. Vaccin.

30 Immunother. 8:81-8 (2012); Центры США по контролю и профилактике заболеваний, "Отчеты о наблюдении за сезонной активностью гриппа за 2001–2018 гг.", www.cdc.gov/flu/weekly/pastreports.htm (по состоянию на 2 июля 2018 г.); Европейский центр профилактики и контроля заболеваний/Европейское региональное бюро ВОЗ, "Ежегодные эпидемиологические отчеты о сезонном гриппе за 2001–2018 гг.",

ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/aer (доступ на 2 июля 2018); Dijkstra et al., *Epidemiol. Infect.* 137:473-9 (2009); Peltola et al., *Clin. Infect. Dis.* 36:299-305 (2003)). Более того, вирус гриппа В вносит основной вклад в общую заболеваемость и смертность от гриппа, при этом уровень госпитализаций аналогичен вирусу гриппа А/Н3N2 и выше чем у А/Н1N1 (Thompson et al., *JAMA* 292:1333-40 (2004)), вызывая 15% всех связанных с гриппом случаев смерти от респираторных заболеваний и сердечно-сосудистых заболеваний в Соединенных Штатах Америки и у 34% пациентов педиатрического отделения (Ambrose et al., *Hum. Vaccin. Immunother.* 8:81-8 (2012); Thompson et al., *JAMA* 289:179-86 (2003)). Эти принципы побудили несколько органов здравоохранения, в том числе Всемирную организацию здравоохранения и Консультативный комитет США по методикам иммунизации, рекомендовать четырехвалентную вакцину против вируса гриппа (QIV), содержащую два антигена вируса гриппа В (по одному из каждой линии В), в качестве одного из предметов выбора сезонной вакцинации (Grohskopf et al., *MMWR Recomm. Rep.* 66:1-20 (2017); Grohskopf et al., *MMWR Recomm. Rep.* 67:643-5 (2018); Всемирная организация здравоохранения, "Рекомендуемый состав вакцин против вируса гриппа для применения в сезоне гриппа 2017–2018 гг. в Северном полушарии", www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en (по состоянию на 2 июля 2018 г.)).

Современная практика иммунизации основана на ранней идентификации циркулирующих вирусов гриппа для обеспечения своевременного получения эффективной сезонной вакцины против вируса гриппа. Помимо неизбежных трудностей в прогнозировании того, какие штаммы будут преобладать во время следующего сезона, в неспособности современных вакцин предупредить заболеваемость и смертность также играют роль устойчивость к противовирусным препаратам и ускользание от иммунного ответа. В дополнение к этому, возможность пандемии, вызванной высоковирулентным штаммом вируса, происходящим из животных-источников и реассортированным с повышением распространения от человека к человеку, представляет собой значительную и реальную угрозу для глобального здравоохранения.

Штаммы вируса гриппа типа В встречаются почти исключительно у людей. Антигенная изменчивость НА в штаммах вируса гриппа типа В является меньшей, чем наблюдаемая в штаммах типа А. Две генетически и антигенно различающиеся линии вируса гриппа В, циркулирующие у людей, представлены линиями В/Yamagata/16/88

(также называемой B/Yamagata) и B/Victoria/2/87 (B/Victoria) (Ferguson et al., 2003).

Хотя спектр заболеваний, вызываемых вирусами гриппа В, как правило, представлен более легкими формами, чем заболевания, вызываемые вирусами гриппа А, все же часто при инфицировании гриппом В наблюдается тяжелая болезнь, требующая госпитализации.

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

Прикрепление к вирусной мембране опосредуется С-концевой якорной последовательностью, соединенной со стеблевым доменом. Белок подвергается посттрансляционному расщеплению в сконструированной петле с получением двух полипептидов НА1 и НА2 (полная последовательность называется НА0). Мембранно-дистальная головная область в основном получена из НА1, а мембранно-проксимальная стеблевая область главным образом получена из НА2.

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

Таким образом, существует необходимость в разработке универсальной вакцины против вируса гриппа, стимулирующей выработку надежного широкого защитного ответа против существующих и будущих штаммов вируса гриппа (как сезонного, так и пандемического), в частности, обеспечивающей защиту против вируса гриппа В для эффективных предупреждения и терапии гриппа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предусмотрены выделенные мутантные полипептиды гемагглютинаина вируса гриппа, способы получения выделенных полипептидов гемагглютинаина, композиции, содержащие их, вакцины, содержащие их, и способы применения композиций и вакцин.

В данном документе предусмотрены выделенные мутантные полипептиды гемагглютинаина вируса гриппа. Выделенные мутантные полипептиды гемагглютинаина вируса гриппа содержат по меньшей мере две стабилизирующие мутации в полипептиде, где стабилизирующие мутации предусматривают мутации по типу замены в (а) аминокислотных положениях 227 и/или 238 и/или (b) аминокислотных положениях 384 и/или 476, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (а) аминокислотном положении 227 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, N, F, I и Y, и/или аминокислотном положении 238 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N, Q, I и F; и/или (b) аминокислотном положении 384 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, N, Q и I, и/или аминокислотном положении 476 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, Y, I, N и Q. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (а) аминокислотном положении 227 заменена на Q, аминокислотном положении 238 заменена на I; и/или (b) аминокислотном положении 384 заменена на I, и аминокислотном положении 476 заменена на I. В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит одну дополнительную стабилизирующую мутацию в полипептиде. Дополнительная стабилизирующая мутация представляет собой замену в аминокислотном положении 461, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению в SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, L, W, Y и R. В определенных вариантах осуществления аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на R. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40. Выделенный мутантный

полипептид гемагглютини́на вируса гриппа может, например, содержать аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:8.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный гликановый мотив в головном домене полипептида. Гликановый мотив может, например, содержать замену в мотиве аминокислотного-связанного гликозилирования в по меньшей мере одном аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из (a) 136 или 137, (b) 141 и (c) 151, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Гликановый мотив может, например, содержать замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 136 и 141, 136 и 151, 137 и 141, 137 и 151 или 141 и 151. В определенных вариантах осуществления гликановый мотив содержит замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 141 и 151. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит или содержит только мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде. Мутация в участке связывания рецептора может, например, содержать замену в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из (a) 175, (b) 219, (c) 257 и (d) 258, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (a) 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y; (b) 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E; (c) 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или (d) 258 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (a) 175 заменена на W, (b) 219 заменена на E, (c) 257 заменена на E или (d) 258 заменено на E. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:55 или SEQ ID NO:61.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в

положении 136, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит или содержит только мутацию в виде делеции проксимальной области слитого пептида (FPPR). Мутация в виде делеции FPPR может, например, содержать делецию от по меньшей мере трех до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями 369 и 382, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Мутация в виде делеции FPPR может, например, содержать делецию, выбранную из группы, состоящей из Δ 372-376, Δ 372-378, Δ 373-377, Δ 373-376, Δ 374-379, Δ 374-376, Δ 376-380, и Δ 377-381. В определенных вариантах осуществления мутация в виде делеции FPPR представляет собой делецию, выбранную из Δ 372-376 или Δ 376-380. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, или SEQ ID NO:84.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа может содержать домен фолдон. В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит карбокси-(C)-концевое усечение, начинающееся в аминокислотном положении от аминокислоты 532 до аминокислотного положения 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления C-концевое усечение начинается в аминокислотном положении 532, 534, 536, 539, 541, 543, 545, 547, или 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в участке расщепления в аминокислотном положении 362, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Замена в

участке расщепления в аминокислотном положении 362 может, например, представлять собой Q.

Также предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа, описанный в данном документе.

Также предусмотрен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

Также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая вектор, описанный в данном документе.

Также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа, выделенную нуклеиновую кислоту мутантного гемагглютиниона гриппа и/или вектор, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа против вируса гриппа у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

Также предусмотрены способы получения выделенного мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа. Способы включают культивирование клетки-хозяина, описанной в данном документе, в условиях, способных обеспечивать продуцирование мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа, и извлечение мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа из клетки или культуры.

Также предусмотрены способы получения фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы включают объединение выделенного мутантного полипептида вируса гриппа с фармацевтически приемлемым носителем.

Различные варианты осуществления и пути применения полипептидов в соответствии с настоящим изобретением станут очевидными из нижеследующего подробного описания настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1А-1В показаны структура и элементы конструкции полипептидов по настоящему изобретению. На ФИГ. 1А показано трехмерное представление полипептидов по настоящему изобретению (представляющих эктодомен НА вируса гриппа В; pdb ID 4NRJ, Ni et al., Virology 450-451:71-83 (2014)). На ФИГ. 1В показано схематическое изображение определенного полипептида по настоящему изобретению

UFV180846 (SEQ ID NO:2) с указанными положениями замен; * введение мотивов N-связанного гликозилирования, † делеция проксимальной области слитого пептида (FPPR): остатки 372-376 пропущены, ‡ С-конец укорочен в данном примере после остатка 536 (нумерация относится к HA WT; SEQ ID NO:1).

5 **На ФИГ. 2А-2F** показан анализ экспрессированных полипептидов EXPI-293 со стабилизирующими мутациями, нормализованными по эталонному HA FL дикого типа B/Brisbane/60/08, содержащему домен тримеризации фолдон (UFV170090) (SEQ ID NO:3). На ФИГ. 2А показано схематическое изображение мономерного эктодомена HA с положениями аминокислотных замен, обозначенными сферами. Указаны остатки, присутствующие в HA дикого типа (WT). На ФИГ. 2В показано связывание AlphaLISA моноклонального антитела CR9114 с полипептидами по настоящему изобретению, несущими различные аминокислотные замены в положении 461. Связывание показано в виде относительного % соответствующей эталонной последовательности HA. На ФИГ. 2С показано связывание AlphaLISA моноклонального антитела CR9114 с полипептидами по настоящему изобретению, несущими различные аминокислотные замены в положениях 227 и 236. Связывание показано в виде относительного % соответствующей эталонной последовательности HA. На ФИГ. 2D показано связывание AlphaLISA моноклонального антитела CR9114 с полипептидами по настоящему изобретению, несущими различные аминокислотные замены в положениях 384 и 476. Связывание показано в виде относительного % соответствующей эталонной последовательности HA. На ФИГ. 2Е показан уровень экспрессии и связывание CR9114, определенные с помощью AlphaLISA, и температурная стабильность, определенная с помощью DSF, полипептидов с комбинациями стабилизирующих замен. Связывание показано в виде относительного % соответствующей эталонной последовательности HA. На ФИГ. 2F показаны профили SEC полипептидов; пунктирная линия представляет HA WT (UFV170090), в том числе домен тримеризации фолдон. Черные линии представляют стабилизированные полипептиды с доменом тримеризации фолдон (UFV170525 (SEQ ID NO:19) и UFV170556 (SEQ ID NO:35)) и без него (UFV171348 (SEQ ID NO:39) и UFV171387 (SEQ ID NO:40)). Символ "-", присутствующий на фигурах 2В, 2С, 2D и 2Е, указывает на то, что остатки WT присутствуют в положении, указанном в заголовке столбца. На ФИГ. 2Е символы "+" и "-" в столбце фолдона указывают соответственно на присутствие или отсутствие С-концевого домена тримеризации фолдона.

На ФИГ. 3А-3В показан анализ полипептидов, экспрессируемых EXPI-293, с введенными мотивами аминокислоты-(N)-связанного гликозилирования в головном домене. На ФИГ. 3А показано схематическое изображение мономерного НА дикого типа с положениями точечных замен, указанными в сферах. На ФИГ. 3В показаны уровни экспрессии белка, содержание тримера и связывание антител, определенные с помощью AlphaLISA. Значения нормализованы к эталонному полипептиду UFV171990 (SEQ ID NO:41) для UFV171991 (SEQ ID NO:45), UFV171992 (SEQ ID NO:44), и UFV171993 (SEQ ID NO:42); и эталонному полипептиду UFV170090 (SEQ ID NO:3) для UFV171472 (SEQ ID NO:42). Символ "+" указывает на присутствие мотива N-связанного гликозилирования в конкретном положении. Символ F указывает на наличие домена тримеризации фолдон.

На ФИГ. 4А-4В показан анализ полипептидов, экспрессируемых EXPI-293, с введенными мутациями вблизи участка связывания рецептора. На ФИГ. 4А показано схематическое изображение мономерного НА с положениями точечных замен, обозначенными сферами. На ФИГ. 4В показаны уровни экспрессии белка, содержание тримера и связывание антител, определенные с помощью AlphaLISA. Значения нормализованы относительно эталонного полипептида UFV171990 (SEQ ID NO:41). Символ "-" указывает на то, что конкретное положение не подвергнуто мутации и присутствует остаток WT.

На ФИГ. 5А-5В показан анализ полипептидов, экспрессируемых EXPI-293, с делециями в проксимальной области слитого пептида (FPPR). На ФИГ. 5А показано схематическое изображение мономерного эктодомена НА с участком удаленного положения в FPPR, обозначенным черными сферами. На ФИГ. 5В показаны уровни экспрессии белка, содержание тримера и связывание антител, определенные с помощью AlphaLISA. Значения нормализованы относительно эталонного полипептида UFV171990 (SEQ ID NO:41).

На ФИГ. 6 показаны профили SEC надосадочных жидкостей культуры EXPI-293, экспрессирующей варианты растворимого тримерного полипептида с альтернативными C-концевыми усечениями (в UFV180454 (SEQ ID NO:71) в положении 549 поэтапно вниз к положению 532 в UFV180462 (SEQ ID NO:79)); полипептид (черная линия) и полноразмерный эталон UFV180284 (SEQ ID NO:70) (пунктирная линия), который включает в себя C-метку.

На ФИГ. 7А-7Е показан анализ надосадочных жидкостей культуры EXPI-CHO, экспрессирующей растворимые полипептиды, и определение *in vitro* характеристик

очищенных полипептидов. Оценивали различные комбинации замен; аминокислоты, связанные гликановые мотивы в головном домене, стабилизирующие замены, замена 257E участка связывания рецептора и делеции FPPR. На ФИГ. 7А показаны профили SEC надосадочной жидкости клеток, экспрессирующих UFV180131 (SEQ ID NO:81) (левая панель), и очищенного UFV180131 (SEQ ID NO:81) (правая панель). На ФИГ. 7В показан уровень экспрессии полипептидов, определенный с помощью ОСТЕТ. Значения EC_{50} стеблевого (CR9114), шейкового (CR8071) и головного доменов (SD84) антител, специфических по отношению к очищенному НА, определенные с помощью ELISA. Температурная стабильность очищенных полипептидов посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии. Символ "-" указывает на то, что конкретное положение не подвергнуто мутации и присутствует остаток WT. На ФИГ. 7С показаны уровни экспрессии белка конструкции UFV180846 (SEQ ID NO:84), экспрессированной в надосадочных жидкостях культуры EXPI-CHO, как определено с помощью ОСТЕТ, значения EC_{50} стеблевого (CR9114), шейкового (CR8071) и головного доменов (34B5 (WO2015/148806)) антител, специфических по отношению к очищенному НА, как определено с помощью ELISA, и температурная стабильность очищенного полипептида посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии. На ФИГ. 7D показано выравнивание линии Victoria (SEQ ID NO:1), линии Yamagata (SEQ ID NO:94), консенсусной последовательности (SEQ ID NO:95), UFV170088 (SEQ ID NO:80), UFV180131 (SEQ ID NO:81), UFV180137 (SEQ ID NO:82), UFV180251 (SEQ ID NO:83), и UFV180284 (SEQ ID NO:). На ФИГ. 7Е показано выравнивание линии Victoria (SEQ ID NO:1), линии Yamagata (SEQ ID NO:94), консенсусной последовательности (SEQ ID NO:95), UFV170088 (SEQ ID NO:80), UFV180846 (SEQ ID NO:84), UFV180847 (SEQ ID NO:91); UFV180848 (SEQ ID NO:92), и UFV180849 (SEQ ID NO:93).

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

5 цистеиновыми остатками, пролин, который образует цикл с полипептидным остовом, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В таблице 1 показаны сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Термин "идентичность аминокислотных последовательностей" относится к степени идентичности или сходства между парой выровненных аминокислотных последовательностей, как правило, выраженной в виде процентного значения. Процент идентичности представляет собой процентное значение аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными (т. е.

аминокислотные остатки в данном положении при выравнивании является таким же остатком) или сходными (т. е. аминокислотная замена в данном положении при

15 выравнивании представляет собой консервативную замену, рассматриваемую ниже) с соответствующим аминокислотным остатком в пептиде после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, с достижением максимального процента гомологии последовательностей. Гомологию

последовательностей, в том числе процентные значения идентичности и сходства

20 последовательностей, определяют с применением методик выравнивания

последовательностей, хорошо известных из уровня техники, например, путем

визуального осмотра и математических расчетов, или, более предпочтительно, сравнение осуществляют путем сравнения информации о последовательностях с

помощью компьютерной программы. В качестве примера, предпочтительной

25 компьютерной программой является разработанная Genetics Computer Group (GCG; Мэдисон, штат Висконсин, США) программа 'GAP' версии 10.0 пакета Wisconsin (Devereux et al. (1984)).

"Консервативная замена" относится к замещению аминокислоты одного класса другой аминокислотой того же класса. В конкретных вариантах осуществления

30 консервативная замена не изменяет структуру или функцию, или и то, и другое,

полипептида. Классы аминокислот для целей выполнения консервативной замены

включают гидрофобные (например, Met, Ala, Val, Leu), нейтральные гидрофильные

(например, Cys, Ser, Thr), кислые (например, Asp, Glu), основные (например, Asn, Gln,

His, Lys, Arg), разрушители конформации (например, Gly, Pro) и ароматические (например, Trp, Tyr, Phe).

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

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" в контексте введения терапевтического средства субъекту относится к количеству терапевтического средства, которое имеет профилактический(-е) и/или терапевтический(-е) эффект(-ы). В определенных вариантах осуществления "эффективное количество" в контексте введения субъекту терапевтического средства относится к количеству терапевтического средства, которое является достаточным для достижения снижения или облегчения тяжести инфекции, вызванной вирусом гриппа, заболевания или симптома, ассоциированных с ней, такому как без ограничения снижение продолжительности инфекции, вызванной вирусом гриппа, заболевания или симптома, ассоциированных с ней, предупреждение прогрессирования инфекции, вызванной вирусом гриппа, заболевания или симптома, ассоциированных с ней, предупреждение развития, или начала проявления, или рецидива инфекции, вызванной вирусом гриппа, заболевания или симптома, ассоциированных с ней, предупреждение или снижение распространения вируса гриппа от одного субъекта к другому субъекту, снижение частоты госпитализации субъекта и/или длительности госпитализации, увеличение выживаемости субъекта с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, или заболеванием, ассоциированным с ней, устранение инфекции, вызванной вирусом гриппа, или заболевания, ассоциированного с ней, ингибирование или уменьшение репликации вируса гриппа, уменьшение титра вируса гриппа и/или усиление и/или улучшение профилактического(-их) или терапевтического(-их) эффекта(-ов) другого терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления эффективное количество не приводит в результате к полной защите от заболевания, вызываемого вирусом гриппа, однако приводит в результате к снижению титра или уменьшению

количества вирусов гриппа по сравнению с субъектом без лечения. Преимущества уменьшения титра, количества или общей нагрузки вируса гриппа включают без ограничения меньшую тяжесть симптомов инфекции, меньшее количество симптомов инфекции и уменьшение длительности заболевания, ассоциированного с инфекцией.

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

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

20 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.

30 Вирусы гриппа классифицируются по типам вирусов гриппа: рода А, В и С. 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 в настоящее время номенклатура штаммов или изолятов вируса гриппа человека включает тип (род) вируса, т. е. А, В или С, и географическое положение первого выделения, номер штамма и год выделения.

Используемый в данном документе термин "заболевание, вызываемое вирусом гриппа" относится к патологическому состоянию, обусловленному наличием вируса гриппа, например вируса гриппа А или В, в клетке или субъекте или инвазией вируса гриппа в клетку или субъекта. В конкретных вариантах осуществления данный термин относится к заболеванию дыхательных путей, причиной которого является вирус гриппа.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" предназначен для включения молекул ДНК (например, cDNA или геномной ДНК) и молекул РНК (например, mRNA), а также аналогов ДНК и РНК, созданных с применением аналогов нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может быть однонитевой или двухнитевой. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть модифицированы химически или биохимически или могут содержать неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания, как будет без труда понятно специалистам в данной области. 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 в определенных вариантах осуществления нумерация аминокислот в гемагглютанине основана на нумерации аминокислот в

гемагглютанине вируса гриппа дикого типа, например, нумерации аминокислот в штамме вируса гриппа A/Brisbane/60/08 (SEQ ID NO: 1). Используемая в настоящем изобретении формулировка "аминокислота в положении "x", таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении x в гемагглютанине конкретного вируса гриппа дикого типа, например A/Brisbane/60/08 (SEQ ID NO: 1).

Специалисту в данной области будет понятно, что посредством множественного выравнивания последовательностей можно определить эквивалентные аминокислоты в других штаммах и/или подтипах вируса гриппа. Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой по всей настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого белка гемагглютиниона (SEQ ID NO: 1). Зрелая последовательность начинается, например, с положения 16 SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области будет понятно, что лидерная последовательность (или сигнальная последовательность), которая определяет направление транспорта белка в ходе продуцирования (например, соответствующая аминокислотам 1-15 SEQ ID NO: 1), обычно отсутствует в конечном полипептиде, который, например, применяют в вакцине. В определенных вариантах осуществления полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, содержат аминокислотную последовательность без лидерной последовательности, т. е. в основе этой аминокислотной последовательности лежит аминокислотная последовательность гемагглютиниона без сигнальной последовательности.

"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).

Термин "вектор" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, в которую может быть вставлена вторая молекула нуклеиновой кислоты для введения хозяину, где она

будет реплицироваться и в некоторых случаях экспрессироваться. Другими словами, вектор способен транспортировать молекулу нуклеиновой кислоты, с которой он был связан. Под используемым в данном документе термином "вектор" подразумеваются векторы для клонирования, а также векторы экспрессии. Векторы включают без

5 ограничения плазмиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы (BAC) и искусственные хромосомы дрожжей (YAC), а также векторы, полученные из бактериофагов или вирусов растений или животных (в том числе человека). Векторы содержат точку начала репликации, распознаваемую предполагаемым хозяином, и, в случае векторов экспрессии, промоторные и другие регуляторные области,

10 распознаваемые хозяином. Определенные векторы способны к автономной репликации в хозяине, которому они введены (например, векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, могут реплицироваться в бактериях). Другие векторы можно встроить в геном хозяина после введения хозяину, и они, таким образом, реплицируются наряду с геномом хозяина.

15 Используемый в данном документе термин "дикого типа" в контексте вируса относится к вирусам гриппа, которые являются преобладающими, циркулируют в естественных условиях и вызывают типичные вспышки заболевания.

Используемый в данном документе термин "гликановый мотив" или "мотив N-связанного гликозилирования" относится к конкретному аминокислотному мотиву

20 полипептида, так что конкретный аминокислотный мотив может быть гликозилирован посредством добавления молекулы гликана. Мотив N-связанного гликозилирования содержит специфический аминокислотный мотив NxT/S (где x не представляет собой P). В полипептиде, где мотив N-связанного гликозилирования или гликановый мотив заменены, указанное аминокислотное положение коррелирует с аспарагином

25 аминокислотного мотива NxT/S. Например, в описанных ниже полипептидах в положениях 136, 137 и 151 в полипептид были введены N и T, при этом N введен в положения 136, 137 и 151, а треонин введен в положения 138, 139 и 153 соответственно, тогда как в положении 141 аспарагин (N) присутствовал в последовательности дикого типа, а мотив был дополнен введением треонина в

30 положение 143.

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 и четырехвалентные вакцины против вируса 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 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, остающихся соединенными дисульфидной связью. Большая часть N-концевого фрагмента (НА1, 320-330 аминокислот) образует мембранно-дистальный глобулярный домен, который содержит рецептор-связывающий участок и большинство детерминант, распознаваемых антителами, нейтрализующими вирус. Меньшая C-концевая часть (НА2, ~ 180 аминокислот) образует стеблеподобную структуру, которая заякоривает глобулярный домен на клеточной или вирусной мембране. Степень гомологии последовательностей полипептидов НА1 меньше, чем степень гомологии последовательностей полипептидов НА2. Наиболее консервативная область представляет собой последовательность вблизи участка расщепления, в частности N-концевые аминокислоты НА2, которые являются консервативными среди всех подтипов вируса гриппа А и В. Часть этой области доступна в виде поверхностной петли в молекуле-предшественнице НА (НА0), однако становится недоступной после расщепления НА0 на НА1 и НА2 (Lorieau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:11341 (2010)).

Большинство нейтрализующих антител связываются с петлями, которые окружают участок связывания рецептора, и препятствуют связыванию с рецептором и прикреплению. Так как эти петли являются высоковариабельными, большинство

антител, нацеленных на эти области, являются штаммоспецифическими, что объясняет то, почему существующие вакцины вызывают выработку такого ограниченного штаммоспецифического иммунитета. Недавно, однако, были созданы полностью человеческие моноклональные антитела к гемагглютнину вируса гриппа с широким спектром перекрестно-нейтрализующей активности. Функциональный и структурный анализ показал, что эти антитела препятствуют процессу слияния мембран и направлены против высоко консервативных эпитопов в стеблевом домене белка НА вируса гриппа (Throsby et al., 2008; Ekiert et al. 2009, WO 2008/028946, WO2010/130636, WO 2013/007770).

Выделенные мутантные полипептиды гемагглютинина

В соответствии с настоящим изобретением были сконструированы новые выделенные мутантные полипептиды гемагглютинина, представляющие эпитопы для распознавания защитными антителами широкого спектра действия. Эти полипептиды можно применять для создания универсальной эпитопной вакцины, индуцирующей защиту от широкого круга штаммов вируса гриппа. Полипептиды стабилизируют, а затем высоковариабельную и иммунодоминантную часть, т. е. головной домен, экранируют, иммунодемпфируют посредством введения молекул гликана. Головка может иметь несколько гликанов для защиты эпитопов от распознавания иммунной системой, перенаправляя тем самым иммунный ответ на более консервативный домен шейки и стебля, чтобы вырабатывать защитные антитела широкого спектра действия.

Выделенные мутантные полипептиды гемагглютинина по настоящему изобретению способны представлять консервативные эпитопы иммунной системе в отсутствие доминантных эпитопов, которые присутствуют в мембранно-дистальном головном домене. Для этого часть первичной последовательности полипептида гемагглютинина, составляющего головной домен, экранирован молекулами гликана. Полученную полипептидную последовательность дополнительно модифицируют путем введения специфических аминокислотных замен, которые стабилизируют нативную 3-мерную структуру оставшейся части полипептида гемагглютинина.

В соответствии с настоящим изобретением выделенные мутантные полипептиды гемагглютинина содержат одну или несколько дополнительных мутаций, т. е. аминокислотные замены и/или замены гликанового мотива, в головном домене, стеблевом домене, и/или замену в участке связывания рецептора, по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего полипептида

гемагглютини́на вируса гриппа дикого типа, т. е. вируса гриппа, который лежит в основе мутантных полипептидов гемагглютини́на.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения выделенные мутантные полипептиды гемагглютини́на содержат аминокислотные замены, замены гликанового мотива, замены участка связывания рецептора и/или мутации в виде делеции. При ссылке на замены и мутации в виде делеции предусмотрены аминокислотное(-ые) положение(-я) для замены(-мен) и/или делеции(-й). Аминокислотное положение соответствует аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, предусмотренной в данном документе. В качестве примера аминокислотная замена в аминокислотном положении 227 будет соответствовать аминокислотной замене лизина (K) в положении 227 SEQ ID NO:1. В качестве другого примера аминокислотная замена в аминокислотном положении 238 будет соответствовать аминокислотной замене гистидина в положении 238 SEQ ID NO:1. Конкретное аминокислотное положение и остаток могут варьироваться в зависимости от исходной последовательности полипептида гемагглютини́на конкретного штамма вируса гриппа; однако специалист в данной области сможет осуществить выравнивание последовательностей для идентификации соответствующего аминокислотного положения и остатка, который соответствует положению в SEQ ID NO:1.

В вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотные замены в конкретных аминокислотных положениях будут выбраны на основе факторов, которые включают без ограничения возможность стерических затруднений, притяжение зарядов, отталкивание зарядов, общие свойства боковой цепи аминокислоты, подходы в отношении вторичной и/или третичной структур и/или частоты использования в соответствующих клетках-хозяевах. Специалисту в данной области должно быть понятно, какие факторы следует учитывать при конструировании аминокислотных замен для выделенных мутантных полипептидов гемагглютини́на вируса гриппа по настоящему изобретению.

В определенных аспектах настоящего изобретения в данном документе предусмотрены выделенные мутантные полипептиды гемагглютини́на вируса гриппа, содержащие по меньшей мере две стабилизирующие мутации в полипептиде, где стабилизирующие мутации предусматривают мутации по типу замены в (а) аминокислотных положениях 227 и/или 238 и/или (b) аминокислотных положениях 384 и/или 476, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (а)

аминокислотном положении 227 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, N, F, I и Y, и/или аминокислотном положении 238 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N, Q, I и F; и/или (b) аминокислотном положении 384 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, N, Q и I, и/или аминокислотном положении 476 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, Y, I, N и Q. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (a) аминокислотном положении 227 заменена на Q, аминокислотном положении 238 заменена на I; и/или (b) аминокислотном положении 384 заменена на I, и аминокислотном положении 476 заменена на I.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит одну дополнительную стабилизирующую мутацию в полипептиде. Дополнительная стабилизирующая мутация представляет собой замену в аминокислотном положении 461, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению в SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, L, W, Y и R. В определенных вариантах осуществления аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на R.

Выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40. Выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:108.

В определенных аспектах настоящего изобретения выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный гликановый мотив в головном домене полипептида. Гликановый мотив может, например, содержать замену в мотиве аминокислотного гликозилирования в по меньшей мере одном аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из (a) 136 или 137, (b) 141 и (c) 151, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Гликановый мотив может, например, содержать замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 136 и 141, 136 и 151, 137 и 141, 137 и 151 или 141 и 151. В определенных вариантах осуществления гликановый мотив содержит замену в

мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 141 и 151. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45.

5 В определенных аспектах настоящего изобретения выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит или содержит только мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде. Мутация в участке связывания рецептора может, например, содержать замену в аминокислотном
10 положении, выбранном из группы, состоящей из (a) 175, (b) 219, (c) 257 и (d) 258, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (a) 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y; (b) 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E; (c) 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или (d) 258 заменена на
15 аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F. В определенных вариантах осуществления аминокислота в (a) 175 заменена на W, (b) 219 заменена на E, (c) 257 заменена на E или (d) 258 заменено на E. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51,
20 SEQ ID NO:55 или SEQ ID NO:61.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в положении 136, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

25 В определенных аспектах настоящего изобретения выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит или содержит только мутацию в виде делеции проксимальной области слитого пептида (FPPR). Мутация в виде делеции FPPR может, например, содержать делецию от по меньшей мере трех до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями
30 369 и 382, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Мутация в виде делеции FPPR может, например, содержать делецию, выбранную из группы, состоящей из Δ 372-376, Δ 372-378, Δ 373-377, Δ 373-376, Δ 374-379, Δ 374-376, Δ 376-380, и Δ 377-381. В определенных вариантах осуществления мутация в виде делеции FPPR представляет собой делецию, выбранную из Δ 372-376

или Δ376-380. В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, или SEQ ID NO:84.

В определенных вариантах осуществления мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в участке расщепления в аминокислотном положении 362, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. Замена в участке расщепления в аминокислотном положении 362 может, например, представлять собой Q.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа получен из гемагглютини́на вируса гриппа В. В частности, выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа может быть получен из гемагглютини́на вируса гриппа В из линии В/Yamagata (обозначенной В/Yamagata/16/88) или из линии В/Victoria (обозначенной В/Victoria/2/87). В определенных вариантах осуществления полипептид получен из В/Brisbane/60/08, В/Iowa/06/2017 или В/Lee/40.

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа может содержать гетерологичный домен тримеризации (например, фолдон).

В определенных вариантах осуществления выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит карбокси-(С)-концевое усечение, начинающееся в аминокислотном положении от аминокислоты 532 до аминокислотного положения 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления С-концевое усечение начинается в аминокислотном положении 532, 534, 536, 539, 541, 543, 545, 547, или 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Гемагглютинин (НА) вируса гриппа в своей нативной форме существует в виде тримера на клеточной или вирусной мембране. В определенных вариантах осуществления внутриклеточную и трансмембранную последовательность удаляют, так что после экспрессии в клетках продуцируется секретируемый (растворимый)

полипептид. Были описаны способы экспрессии и очистки секретируемых эктодоменов
 HA (см., например, Dopheide et al 2009; Ekiert et al 2009, 2011; Stevens et al 2004, 2006;
 Wilson et al 1981). Специалисту в данной области будет понятно, что эти способы
 можно также применять непосредственно к выделенным мутантным полипептидам
 5 гемагглютинаина по настоящему изобретению для достижения экспрессии
 секретируемого (растворимого) полипептида. Таким образом, эти полипептиды также
 охватываются настоящим изобретением.

Необязательно, последовательность His-метки (НННННН (SEQ ID NO: 85) или
 ННННННН (SEQ ID NO: 86)), необязательно присоединяемую посредством линкера,
 10 можно соединять с (необязательно усеченным) выделенным мутантным полипептидом
 гемагглютинаина для целей очистки. Линкер необязательно может содержать участок
 протеолитического расщепления для ферментативного удаления His-метки после
 очистки.

В определенных вариантах осуществления полипептиды дополнительно
 15 стабилизируют путем введения последовательности, которая, как известно, образует
 тримерные структуры, т. е. GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 87)
 на С-конце выделенного мутантного полипептида гемагглютинаина, необязательно
 соединенного посредством линкера. Таким образом, в определенных вариантах
 осуществления С-концевая часть выделенного мутантного полипептида
 20 гемагглютинаина заменена аминокислотной последовательностью
 GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 87),, необязательно
 соединенной посредством линкера. Линкер может содержать участок расщепления для
 последующего процессинга в соответствии с протоколами, хорошо известными
 специалистам в данной области. Для облегчения очистки растворимой формы можно
 25 добавлять последовательность метки, например, гистидиновую метку (НННННН (SEQ
 ID NO: 85) или ННННННН (SEQ ID NO: 86)) или FLAG-метку (DYKDDDDK) (SEQ ID
 NO: 88) или их комбинацию, необязательно присоединяемую посредством коротких
 линкеров. Линкер может необязательно содержать участок (часть участка)
 протеолитического расщепления, например, IEGR (SEQ ID NO: 89) (фактор X) или
 30 LVPRGS (SEQ ID NO: 90) (тромбин), для последующего процессинга согласно
 протоколам, хорошо известным специалистам в данной области. Процессированные
 белки также охватываются настоящим изобретением.

Мутантные полипептиды гемагглютинаина вируса гриппа можно получать в соответствии с любой методикой, которая считается подходящей для специалиста в данной области, включая методики, описанные ниже.

Таким образом, иммуногенные полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в виде последовательностей ДНК с помощью стандартных способов, известных из уровня техники, и клонировать, а затем экспрессировать *in vitro* или *in vivo* с использованием подходящих ферментов рестрикции и способов, известных из уровня техники. Настоящее изобретение, таким образом, также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные выше полипептиды.

Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является частью вектора, например плазмиды. С такими векторами можно легко производить манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, можно сконструировать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. В дополнение, многие векторы можно непосредственно или в форме выделенного из них требуемого фрагмента использовать для трансформации эукариотических клеток и интегрировать целиком или частично в геном таких клеток с получением стабильных клеток-хозяев, содержащих требуемую нуклеиновую кислоту в своем геноме. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для обеспечения транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. При использовании клеток-хозяев предпочтительно, чтобы вектор представлял собой интегрирующий вектор. В качестве альтернативы, вектор может представлять собой эписомально реплицирующийся вектор.

Специалист в данной области способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функциональным образом. Специалистам в данной области хорошо известно, что для достижения экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды, последовательности, способные управлять экспрессией, можно функционально связать с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид, с получением рекомбинантных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок или полипептид в экспрессируемом формате. Как

правило, промоторную последовательность помещают выше последовательностей, которые должны экспрессироваться. Из уровня техники доступны многие векторы экспрессии, например серия векторов pcDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т. д., которые можно использовать с

5 получением подходящих промоторов и/или последовательностей терминаторов транскрипции, последовательностей поли-А и т. п. Если последовательность, кодирующая полипептид, представляющий интерес, вставлена надлежащим образом относительно последовательностей, регулирующих транскрипцию и трансляцию

10 кодируемого полипептида, то полученная кассета экспрессии применима для продуцирования полипептида, представляющего интерес, что называется экспрессией. Последовательности, управляющие экспрессией, могут включать в себя промоторы, энхансеры и т. п., а также их комбинации. Они должны быть способными функционировать в клетке-хозяине, тем самым управляя экспрессией

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

20 разработать искусственным путем. Экспрессия нуклеиновых кислот, представляющих интерес, может происходить под управлением природного промотора или его производного или под управлением полностью гетерологичного промотора (Kaufman, 2000). Некоторые хорошо известные и наиболее часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках включают в себя промоторы, полученные из

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

30 промоторы, такие как промоторы генов металлотионеинов (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 специалиста в данной области и, как правило, может охватывать клонирование тестируемого гена, такого как ген lacZ,

люциферазы, GFP и т. д., позади промоторной последовательности и тестирование экспрессии тестируемого гена. Разумеется, промоторы можно изменять посредством делеции, добавления, мутации последовательностей в них и тестировать в отношении функциональности для обнаружения новых, ослабленных или улучшенных, промоторных последовательностей. В соответствии с настоящим изобретением 5 сильные промоторы, которые обеспечивают высокие уровни транскрипции в выбранных эукариотических клетках, являются предпочтительными.

Конструкции можно вводить путем трансфекции в эукариотические клетки (например, клетки растений, грибов, дрожжей или животных) или подходящие 10 прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, с помощью способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых случаях приемлемую последовательность "метки" (такой как, например, без ограничения His-, Мус-, Strep- или FLAG-метка) или полного белка (такого как, например, без ограничения мальтозосвязывающий белок или глутатион-S-трансфераза) можно добавлять к 15 последовательностям по настоящему изобретению для обеспечения очистки и/или идентификации полипептидов из клеток или надосадочной жидкости. Необязательно можно включить последовательность, содержащую специфический участок протеолиза, для последующего удаления метки путем протеолитического расщепления.

Очищенные полипептиды можно анализировать с помощью 20 спектроскопических способов, известных из уровня техники (например, спектроскопии кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и ЯМР-спектроскопии или рентгеновской кристаллографии), для исследования наличия необходимых структур, таких как спирали и бета-складчатые слои. ELISA, Octet и FACS и т. п. можно применять для исследования связывания полипептидов по 25 настоящему изобретению с нейтрализующими антителами широкого спектра действия, описанными ранее (CR9114, CR8071, CR8033) (Dreyfus et al., Science 337(6100):1343-8 (2012)). Таким образом, можно выбрать полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, имеющие нужную конформацию.

Фармацевтические/иммуногенные композиции и способы их применения

Настоящее изобретение дополнительно относится к иммуногенным 30 композициям, содержащим терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из полипептидов и/или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Иммуногенные композиции предпочтительно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего изобретения термин

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

Настоящее изобретение также относится к мутантным полипептидам гемагглютини́на вируса гриппа, молекулам нуклеиновых кислот и/или векторам, описанным выше, для применения в индуцировании иммунного ответа против белка НА вируса гриппа. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, описанных выше. Субъект в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой млекопитающее, которое можно инфицировать возбудителем инфекционного заболевания, в частности вирусом гриппа, или может иным образом получить пользу от индукции иммунного ответа, при этом такой субъект, например, является грызуном, например мышью, хорьком, или домашним или сельскохозяйственным животным, или приматом, отличным от человека, или человеком. Предпочтительно, субъект является субъектом-человеком. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способы индуцирования у субъекта иммунного ответа на гемагглютинин (НА) вируса гриппа с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций, описанных в данном документе.

Поскольку хорошо известно, что небольшие белки и/или молекулы нуклеиновых кислот не всегда эффективно индуцируют сильный иммунный ответ, то может быть необходимо увеличить иммуногенность полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот путем добавления вспомогательного средства. В определенных вариантах осуществления иммуногенные композиции, описанные в данном документе, содержат вспомогательное средство или вводятся в комбинации с ним. Вспомогательное средство для введения в комбинации с композицией, описанной в данном документе, можно вводить до введения, одновременно с введением или после введения указанной композиции. Примеры подходящих вспомогательных средств включают в себя соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции масляных эмульсий (или композиции типа "масло в воде"), в том числе эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотив, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT *E. coli*, холерный токсин СТ, коклюшный токсин РТ или столбнячный анатоксин ТТ, Matrix М (Isconova). В дополнение, можно применять известные иммуностимулирующие технологии, такие как слияние полипептидов по настоящему изобретению с белками, известными из уровня техники как усиливающие иммунный ответ (например, со столбнячным анатоксином, CRM197, rCTB, бактериальными флагеллинами или другими), или включение полипептидов в виросомы, или их комбинации. Другими неограничивающими примерами, которые можно применить, являются, например, раскрытые Coffman et al. (2010).

В одном варианте осуществления полипептиды мутантного гемагглютинина вируса гриппа по настоящему изобретению включены в векторы на основе вирусоподобных частиц (VLP). VLP обычно содержат вирусный(-е) полипептид(-ы), как правило, полученный(-ые) из структурного(-ых) белка(-ов) вируса. Предпочтительно, VLP не способны к репликации. В определенных вариантах осуществления VLP могут не содержать полный геном вируса или могут содержать часть генома вируса. В некоторых вариантах осуществления VLP не способны инфицировать клетку. В некоторых вариантах осуществления VLP экспрессируют на

своей поверхности один или несколько вирусных (например, поверхностный гликопротеин вируса) или невирусных (например, антитело или белок) нацеливающих фрагментов, известных специалисту в данной области.

В конкретном варианте осуществления полипептиды по настоящему изобретению включены в виросому. Виросому, содержащую полипептид в соответствии с настоящим изобретением, можно получить с помощью методик, известных специалисту в данной области. Например, виросому можно получить путем разрушения очищенного вируса, извлечения генома и повторной сборки частиц с вирусными белками (например, мутантными полипептидами гемагглютинаина вируса гриппа, описанными в данном документе) и липидами с образованием липидных частиц, содержащих вирусные белки.

Настоящее изобретение также относится к описанным выше полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для индуцирования иммунного ответа у субъекта против НА вируса гриппа, в частности для применения в качестве вакцины. Полипептиды мутантного гемагглютинаина вируса гриппа, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, или векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты или полипептиды, описанные в данном документе, таким образом, могут использоваться для того, чтобы вызвать выработку защитных антител против вирусов гриппа, например против домена шейки или стебля гемагглютинаина вируса гриппа. В частности, настоящее изобретение относится к описанным выше полипептидам, нуклеиновым кислотам и/или иммуногенным композициям для применения в качестве вакцины для предупреждения и/или лечения заболевания или состояния, вызываемого вирусом гриппа.

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

Введение полипептидов, молекул нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие примеры включают в себя парентеральное введение, такое как внутривенное, внутрикожное, чрескожное,

внутримышечное, подкожное и т. д., или введение через слизистую оболочку, например интраназальное, пероральное и т. п. Специалист в данной области будет способен определить различные возможности для введения полипептидов, молекул нуклеиновых кислот и/или иммуногенных композиций в соответствии с настоящим изобретением с целью индукции иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию (или вакцину) вводят более чем один раз, т. е. в так называемом режиме гомологичного прайм-буста. В определенных вариантах осуществления, где полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию вводят более чем один раз, введение второй дозы можно осуществлять через интервал времени, составляющий, например, одну неделю или более после введения первой дозы, две недели или более после введения первой дозы, три недели или более после введения первой дозы, один месяц или более после введения первой дозы, шесть недель или более после введения первой дозы, два месяца или более после введения первой дозы, 3 месяца или более после введения первой дозы, 4 месяца или более после введения первой дозы и т. д., вплоть до нескольких лет после введения первой дозы полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции. Вакцину также можно вводить более двух раз, например, три раза, четыре раза и т. д., так, чтобы за первым примирующим введением следовало более чем одно бустерное введение. В других вариантах осуществления полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты и/или иммуногенную композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят только один раз.

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

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы предупреждения и/или лечения заболевания, вызываемого вирусом гриппа, у субъекта с использованием полипептидов, нуклеиновых кислот и/или композиций, описанных в данном документе. В конкретном варианте осуществления способ профилактики и/или лечения заболевания вирусом гриппа у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида, нуклеиновой кислоты и/или иммуногенной композиции, которые описаны выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, нуклеиновой кислоты и/или композиции, которые определены в данном документе, 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. Облегчение, как используется в данном документе, может относиться к ослаблению видимых или осязаемых симптомов заболевания, вирусемии или любых других поддающихся измерению проявлений инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже имеют состояние, являющееся результатом инфицирования вирусом гриппа, а также тех, у которых необходимо предупредить инфицирование вирусом гриппа. Полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или композиции по настоящему изобретению, таким образом, можно вводить субъекту, ранее не получавшему лечение, т. е. субъекту, у которого отсутствует заболевание, вызванное инфекцией вирусом гриппа, или который не был инфицирован и в настоящее время не инфицирован вирусом гриппа, или субъектам, которые уже инфицированы и/или были инфицированы вирусом гриппа.

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

В другом варианте осуществления полипептиды, нуклеиновые кислоты и/или иммуногенные композиции можно вводить субъекту в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами, такими как существующие или будущие вакцины против вируса гриппа, моноклональные антитела, и/или противовирусные средства, и/или антибактериальные, и/или иммуномодулирующие средства. Одно или несколько других активных средств могут быть полезными в лечении и/или предупреждении заболевания, вызываемого вирусом гриппа, или могут облегчать симптом или состояние, ассоциированное с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других активных средств представляют собой обезболивающие средства, жаропонижающие

лекарственные препараты или терапевтические средства, которые облегчают дыхание или способствуют ему.

Режимы дозирования полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно скорректировать для обеспечения оптимального
5 необходимого ответа (например, терапевтического ответа). Подходящий диапазон доз может, например, составлять 0,1-100 мг/кг веса тела, предпочтительно 1-50 мг/кг веса тела, предпочтительно 0,5-15 мг/кг веса тела. Точная доза полипептидов и/или молекул нуклеиновых кислот, которые подлежат использованию, будет, например, зависеть от
10 пути введения и серьезности инфекции или заболевания, вызываемого ею, и должна быть выбрана в соответствии с решением практикующего врача и состоянием каждого субъекта. Например, эффективные дозы варьируют в зависимости от участка-мишени, физиологического состояния пациента (в том числе возраста, массы тела, состояния здоровья) и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент является человеком, однако лечению также можно подвергать
15 млекопитающих, отличных от человека, в том числе трансгенных млекопитающих. Для оптимизации безопасности и эффективности подбирают оптимальные лечебные дозы.

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

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

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

5 ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В настоящем изобретении также предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления.

10 Вариант осуществления 1 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа, содержащий по меньшей мере две стабилизирующие мутации в полипептиде, где стабилизирующие мутации содержат мутации по типу замены в:

- a. аминокислотных положениях 227 и/или 238 и/или
- b. аминокислотных положениях 384 и/или 476,

15 где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 1, где

- a. аминокислота в аминокислотном положении 227 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, N, F, I и Y, и/или аминокислота в
20 аминокислотном положении 238 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N, Q, I и F; и/или
- b. аминокислота в аминокислотном положении 384 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, N, Q и I, и/или аминокислота в
25 аминокислотном положении 476 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, Y, I, N и Q.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 2, где

- a. аминокислота в аминокислотном положении 227 заменена на Q и
аминокислота в аминокислотном положении 238 заменена на I; и/или
- 30 b. аминокислота в аминокислотном положении 384 заменена на I и
аминокислота в аминокислотном положении 476 заменена на I.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-3, дополнительно содержащий одну стабилизирующую мутацию в

полипептиде, где стабилизирующая мутация представляет собой замену в аминокислотном положении 461, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению в SEQ ID NO:1.

5 Вариант осуществления 5 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 4, где аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из M, L, W, Y и R.

10 Вариант осуществления 6 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 5, где аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на R.

15 Вариант осуществления 7 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 3, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:39 или SEQ ID NO:40.

20 Вариант осуществления 8 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 6, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:8.

25 Вариант осуществления 9 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-8, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный гликановый мотив в головном домене полипептида.

30 Вариант осуществления 10 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 9, где гликановый мотив содержит замену в мотиве аминокислотного связывания в по меньшей мере одном аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:

- a. 136 или 137,
- b. 141 и
- c. 151,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 10, где гликановый мотив содержит замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 136 и 141, 136 и 151, 137 и 141, 137 и 151 или 141 и 151.

5 Вариант осуществления 12 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 11, где гликановый мотив содержит замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 141 и 151.

10 Вариант осуществления 13 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 10, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, или SEQ ID NO:45.

15 Вариант осуществления 14 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-13, дополнительно содержащий мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде.

20 Вариант осуществления 15 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 14, где мутация в участке связывания рецептора содержит замену в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:

- a. 175,
- b. 219,
- c. 257, и
- 25 d. 258,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

30 Вариант осуществления 16 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 15, где

- a. аминокислота в 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y;
- b. аминокислота в 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E;

- c. аминокислота в 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или
- d. аминокислота в 258 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F.

5 Вариант осуществления 17 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 16, где

- a. аминокислота в 175 заменена на W,
- b. аминокислота в 219 заменена на E,
- c. аминокислота в 257 заменена на E или
- 10 d. аминокислота в 258 заменена на E.

Вариант осуществления 18 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 17, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:55 или
15 SEQ ID NO:61.

Вариант осуществления 19 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 14-18, где полипептид дополнительно содержит аминокислотную замену в положении 136, где аминокислотное положение соответствует
20 аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 20 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-19, дополнительно содержащий мутацию в виде делеции проксимальной области слитого пептида (FPPR).

25 Вариант осуществления 21 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 20, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию от по меньшей мере трех до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями 369 и 382, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID
30 NO:1.

Вариант осуществления 22 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 21, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из группы,

состоящей из Δ372-376, Δ372-378, Δ373-377, Δ373-376, Δ374-379, Δ374-376, Δ376-380, и Δ377-381.

Вариант осуществления 23 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 22, где
5 мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из Δ372-376 или Δ376-380.

Вариант осуществления 24 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 23, где
10 мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.

Вариант осуществления 25 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-24, где мутантный полипептид гемагглютинаина содержит
15 аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83 или SEQ ID NO:84.

Вариант осуществления 26 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа, содержащий мутацию в виде делеции проксимальной области слитого пептида (FPPR), где мутация в виде делеции FPPR
20 предусматривает делецию от по меньшей мере трех до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями 369 и 382, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 27 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 26, где
25 мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из группы, состоящей из Δ372-376, Δ372-378, Δ373-377, Δ373-376, Δ374-379, Δ374-376, Δ376-380, и Δ377-381.

Вариант осуществления 28 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно вариантам осуществления 26 или 27, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из Δ372-
30 376 или Δ376-380.

Вариант осуществления 29 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа согласно варианту осуществления 28, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.

Вариант осуществления 30 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа, содержащий мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде, где мутация в участке связывания рецептора предусматривает мутацию по типу замены в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:

- a. 175,
- b. 219,
- c. 257, и
- d. 258,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 31 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа согласно варианту осуществления 30, где

- a. аминокислота в 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y;
- b. аминокислота в 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E;
- c. аминокислота в 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или
- d. аминокислота в 258 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F.

Вариант осуществления 32 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа согласно варианту осуществления 31, где

- a. аминокислота в 175 заменена на W,
- b. аминокислота в 219 заменена на E,
- c. аминокислота в 257 заменена на E или
- d. аминокислота в 258 заменена на E.

Вариант осуществления 33 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа согласно варианту осуществления 32, где мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:55 или SEQ ID NO:61.

Вариант осуществления 34 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа согласно любому из вариантов

осуществления 30-33, где полипептид дополнительно содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 136, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

5 Вариант осуществления 35 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-17, 19-23, 26-28, 30-32 или 34, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа содержит гетерологичный домен тримеризации.

10 Вариант осуществления 36 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из пунктов 1-34, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит карбокси-(С)-концевое усечение, начинающееся в аминокислотном положении от аминокислоты 532 до аминокислотного положения 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

15 Вариант осуществления 37 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту осуществления 36, где С-концевое усечение начинается в аминокислотном положении 532, 534, 536, 539, 541, 543, 545, 547 или 549.

20 Вариант осуществления 38 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-37, где мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в участке расщепления в аминокислотном положении 362, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

25 Вариант осуществления 39 представляет собой выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно варианту 38, где аминокислота в аминокислотном положении 362 заменена на Q.

Вариант осуществления 40 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенный мутантный полипептид гемагглютини́на вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-39.

30 Вариант осуществления 41 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 40.

Вариант осуществления 42 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор согласно варианту осуществления 41.

Вариант осуществления 43 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенный мутантный полипептид гемагглютиниона вируса гриппа согласно любому из вариантов осуществления 1-39 и фармацевтически приемлемый носитель.

5 Вариант осуществления 44 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 40.

Вариант осуществления 45 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую вектор согласно варианту осуществления 41.

10 Вариант осуществления 46 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа против вируса гриппа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающегося в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 43-45.

15 Вариант осуществления 47 представляет собой способ получения выделенного мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа, включающий культивирование клетки-хозяина согласно варианту осуществления 42 в условиях, способных обеспечивать продуцирование мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа, и извлечение мутантного полипептида гемагглютиниона вируса гриппа из клетки или культуры.

20 Вариант осуществления 48 представляет собой способ получения фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 43, при этом способ включает объединение выделенного мутантного полипептида вируса гриппа с фармацевтически приемлемым носителем.

ПРИМЕРЫ

25 **Таблица 1.** 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

Аминокислота	3- буквенный код	1- буквенный код	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
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

Пример 1. Полипептиды на основе стебля – элементы разработанных структур и схем

Структура и расположение изменений в последовательности полипептидов, представляющих эктодомен гемагглютиниона вируса гриппа (HA₀), показаны на ФИГ.

5 1А. При экспрессии в виде растворимого эктодомена полипептиды были усечены на карбокси-(С)-конце; например, в положении 536 SEQ ID NO:1, поскольку отмечено, что для UFV180846, SEQ ID NO:2, полипептид состоял только из 535 аминокислот, за исключением нативного С-концевого трансмембранного и цитозольного доменов (аминокислоты 550-585). Отмечено, что для нумерации аминокислотных положений
10 использовалась нумерация HA В/Brisbane/60/08 дикого типа (SEQ ID NO:1) и она включала сигнальный пептид (остатки 1-15).

Для стабилизации HA, увеличения экспрессии и обеспечения правильного сворачивания и тримеризации, аналогичных исходному полноразмерному HA дикого типа, в полипептиды вводили замены в положениях 227, 238, 384, 461 и 476 (ФИГ. 1А-
15 1В).

Чтобы улучшить доступность стеблевого эпитопа HA для широко связывающихся антител, например mAb CR9114 (которое описано в WO2013/007770), длину гибкой петли, содержащей проксимальную слитую область (FPPR, аминокислоты 362-382), уменьшали на приблизительно 5 аминокислот в определенных
20 полипептидах.

Чтобы воспрепятствовать связыванию рецептора или антитела с поверхностями, контактирующими с растворителем, головного домена НА в определенных полипептидах, в консервативном участке связывания рецептора (RBS) производили замену (Q257E) и/или заменяли один или несколько аминокислотных остатков для введения мотива аминокислоты-(N)-связанного гликозилирования (NxS/T, тогда как x не представлял собой Р, т. е. в положениях 136, 141 и 151) или альтернативно заменяли заряженным остатком (т. е. в положениях 136 и 257).

Полипептиды могли быть устойчивыми к расщеплению трипсиноподобной протеазой путем замены природного одноосновного участка расщепления, аминокислоты аргинина (R) в положении 362 (ФИГ. 1В), например, на глутамин (Q). В отличие от нативного НА до слияния, полипептиды по настоящему изобретению, содержащие замену R329Q, устойчивы к трипсиноподобной протеазе и не могут больше расщепляться. Без расщепления на НА₁ и НА₂ белок гемагглютинирина вируса гриппа не может подвергаться конформационным изменениям до состояния после слияния и впоследствии не мог опосредовать слияние вируса.

Пример 2. Определение характеристик стабилизирующих мутаций

Разработанные структуры

Растворимые полипептиды представляли собой гемагглютинин (НА) вируса гриппа типа В. Множественные замены остатков с целью стабилизации и улучшения сворачивания полипептидов тестировали в положении 461 (ФИГ. 2В), в положениях 227 и 238 (ФИГ. 2С) и в положениях 384 и 476 (ФИГ. 2D). Экспрессию и сворачивание полипептидов оценивали в надосадочной жидкости клеточной культуры Expi293F.

Экспрессия белка в клетках млекопитающих

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, синтезировали (Genscript; Пискаутауэй, штат Нью-Джерси, США) и клонировали в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плаزمида pcDNA3 с усиленным промотором CMV).

Полипептиды содержали карбокси-(С)-концевой домен тримеризации фолдон (за исключением UFV171348, SEQ ID NO:39 и UFV171387, SEQ ID NO:40) и метку FLAG-линкер-His для целей скрининга и очистки. Их получали в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл). Вкратце, клетки временно трансфицировали посредством ДНК промышленного качества в 96-луночных планшетах с глубокими лунками с половинным объемом (System Duetz) при плотности клеток $2,5 \times 10^5$ клеток/мл с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine

293 (Gibco, ThermoFisher Scientific; Уолтем, штат Массачусетс, США) и инкубировали в среде для экспрессии Expi293 (Gibco, ThermoFisher Scientific) при 37°C, 250 об/мин., 8% CO₂ и влажности 75%. Надосадочные жидкости клеточных культур, содержащие секретируемые полипептиды, собирали в день 3 и очищали центрифугированием (10 минут при 400 x g) с последующей фильтрацией (96-луночные фильтровальные планшеты, мембрана PVDF 0,22 мкм, Corning; Корнинг, штат Нью-Йорк, США).

Анализ надосадочной жидкости культуры

Экспрессию и сворачивание полипептидов оценивали с помощью гомогенного анализа усиления люминесценции при сближении (AlphaLISA, ФИГ. 2B-2D) в соответствии с инструкциями производителя (PerkinElmer; Уолтем, штат Массачусетс, США). Этот анализ равновесия в растворе и при связывании основан на успешном связывании как донорной, так и акцепторной гранул с полипептидами посредством специфических антител. Находясь в непосредственной близости, лазерное облучение донорной гранулы при длине волны 680 нм генерировало поток синглетного кислорода, запуская химические процессы в соседней акцепторной грануле, что приводило к хемилюминесцентной эмиссии при длине волны 615 нм. Уровни экспрессии измеряли посредством системы Expression-AlphaLISA путем одновременного добавления донорных гранул никеля (которые связывались/образовывали комплексы с His-меткой) и гранул, соединенных с антителом, направленным против метки FLAG, в надосадочную жидкость клеточной культуры. Эта система Expression-AlphaLISA распознавала С-концевую метку FLAG-линкер-His независимо от сворачивания полипептидов. Правильное сворачивание полипептидов оценивали в Binding-AlphaLISA путем одновременного добавления донорных гранул никеля, антитела CR9114 к человеческому IgG (которое описано в WO2013/007770) в концентрации 2 нМ и акцепторных гранул антитела к человеческому IgG в надосадочную жидкость клеточной культуры. Сигнал получали только в том случае, если полипептид был правильно свернут и допускал связывание IgG вируса гриппа, специфических по отношению к НА.

Для всех систем AlphaLISA гранулы детектора 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). Данные нормализовали относительно эталонной конструкции

UFV170090 (SEQ ID NO:3), HA дикого типа B/Brisbane/60/08 (SEQ ID NO:1), включающего домен тримеризации фолдон, и метки FLAG-линкер-His, которая была установлена на 100%.

Термостабильность полипептидов определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) путем мониторинга флуоресцентной эмиссии красителя Sypro Orange (ThermoFisher Scientific), добавленного в надосадочную жидкость культуры. При постепенном повышении температуры от 25°C до 95°C (60°C в час) полипептиды разворачивались и флуоресцентный краситель связывался с подвергнутыми воздействию гидрофобными остатками, что приводило к характерному изменению эмиссии. Кривые плавления измеряли с использованием устройства для ПЦР в реальном времени ViiA7 (Applied Biosystems; Фостер-Сити, штат Калифорния, США) и значения T_{m50} рассчитывали с помощью пакета Spotfire (Tibco Software Inc.; Пало-Альто, штат Калифорния, США). Значения T_{m50} представляли собой температуру, при которой разворачивалось 50% белка, и, таким образом, являлись мерой температурной стабильности полипептидов.

Содержание экспрессированных полипептидов в клеточной культуре Expi293F оценивали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) в ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (UHPLC) с использованием системы Vanquish (ThermoFisher Scientific) с колонкой BEH 200A (Waters, вводимый объем 40 мкл, скорость потока 0,35 мл/мин.). Элюирование контролировали с помощью детектора светорассеяния Helios (Wyatt Technology; Голета, штат Калифорния, США). SEC-профили анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology).

Результаты и вывод

Большинство альтернативных аминокислот в положении 461 были хорошо переносимыми, за исключением триптофана (UFV171702, SEQ ID NO:6), который приводил в результате к снижению на ~40% связывания mAb CR9114 (ФИГ. 2B). Полипептид UFV171741 (SEQ ID NO:8), который включал остаток аргинина в положении 461, демонстрировал ~2,8-кратное увеличение связывания mAb CR9114. Замена остатка в положении 227 приводила в результате к ~1,5-кратному увеличению связывания CR9114 с тестируемыми аминокислотами, тогда как замены в положении 238 не влияли на связывание антитела (ФИГ. 2C). Комбинация глутамина и изолейцина в этих положениях соответственно приводила в результате к значительному увеличению связывания CR9114 (~2,5-кратному). Введение замен в положение 384

приводило к 3-4-кратному снижению связывания CR9114, тогда как замены в положении 476 были хорошо переносимыми или приводили в результате к умеренному повышению уровней связывания (UFV170550 (SEQ ID NO:29) и UFV170551 (SEQ ID NO:30)). Полипептиды с заменой обоих остатков демонстрировали значительное

5 снижение связывания CR9114, за исключением случаев, когда оба остатка были заменены на изолейцин. Эта комбинация (UFV170556 (SEQ ID NO:35)) продемонстрировала ~2,3-кратное увеличение связывания CR9114 (ФИГ. 2C). По температурной стабильности полипептида, определенной с помощью DSF, наблюдали увеличение T_{m50} на 3,9°C при введении замен Q227 и I238 (UFV170525 (SEQ ID NO:19)

10 по сравнению с UFV170090 (SEQ ID NO:3), тогда как на уровень экспрессии существенно не повлияло (ФИГ. 2D).

Не наблюдался какой-либо заметный эффект от замен I384 и I476 в отношении температурной стабильности (снижение на 0,5°C), однако полипептид, включающий в себя эти мутации (UFV170556 (SEQ ID NO:35)) проявлял повышенный уровень

15 экспрессии (1,4-кратный) и повышенное связывание CR9114 (~2-кратное). Удаление домена тримеризации фолдона также приводило в результате к повышению уровня экспрессии (UFV171348 (SEQ ID NO:39)) по сравнению с UFV170556 (SEQ ID NO:35)), однако наблюдалось снижение связывания CR9114. Комбинация всех четырех (4) благоприятных замен в положениях 227, 238, 384 и 476 приводила в результате к

20 полипептиду, который хорошо экспрессировался (2-кратное повышение по сравнению с эталоном) и хорошо связывался с CR9114 (~1,7-кратное повышение по сравнению с эталоном). Поразительно, что полипептид был очень стабильным (T_{m50} составляла 64,7°C, что на 5,2°C выше, чем у исходной конструкции) и экспрессировался как растворимый тримерный полипептид в отсутствие домена тримеризации фолдона

25 (ФИГ. 2F).

В совокупности результаты показали, что с помощью замены четырех (4) остатков в ядре НА был создан полипептид, который образовывал растворимые тримеры в отсутствие гетерологичных доменов тримеризации, которые представляли собой правильно свернутую и стабильную конформацию до слияния НА вируса гриппа

30 В дикого типа.

Пример 3. Определение характеристик добавленных мотивов N-связанного гликозилирования к головному домену

Разработанные структуры

В различные положения вводили мотивы N-связанного гликозилирования NxT/S (где x не представлял собой P) в головной домен полипептидов. Для положений 136, 137 и 151 вводили N и T, тогда как для положения 141 в последовательности дикого типа присутствовал аспарагин, а мотив был дополнен введением треонина в положение 143 (ФИГ. 3А).

Анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды, включающие в себя метку FLAG-линкер-His, для целей скрининга и очистки продуцировались в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл). UFV171472 (SEQ ID NO:43) экспрессировался с доменом тримеризации фолдоном, при этом другие полипептиды экспрессировались без домена тримеризации фолдона.

Экспрессию и сворачивание полипептидов по настоящему изобретению оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примере 2. Связывание CR8071 (Dreyfus et al., Science 337(6100):1343-8 (2012)) и SD84 (Laursen et al., Science 362(6414):598-602 (2018)) осуществляли при концентрации 1,5 нМ и 2 нМ соответственно. Для определения содержания тримерных полипептидов, присутствующих в надосадочной жидкости культуры, применяли систему trimer-AlphaLISA. Анализ trimer-AlphaLISA основывался на человеческих IgG, таких как 46B8C (WO2015/148806A1), которые специфически связывались с мономерным НА. Если смесь 1:1 по-разному меченого 46B8C (меченого биотином или DIG) добавляли к НА, то сигнал AlphaLISA выявлялся только в том случае, если присутствовал мультимер, допускающий связывание по меньшей мере двух антител. Ранее было показано, что эта система trimer-AlphaLISA предпочтительно выявляла тримеры и была нечувствительной к димерам, мультимерам или мономерам. Trimer-AlphaLISA осуществляли путем одновременного добавления донорных гранул со стрептавидином и акцепторных гранул с антителом DIG к IgG в надосадочной жидкости культуры в присутствии биотинилированных и DIG-меченых IgG 46B8C (каждый в концентрации 1 нМ). Данные для полипептидов UFV171991 (SEQ ID NO:45), UFV171992 (SEQ ID NO:44), и UFV171993 (SEQ ID NO:42) нормализовали к эталонной конструкции UFV171990 (SEQ ID NO:41), представляющей собой стабилизированный НА

В/Brisbane/60/08. Для полипептида UFV171472 (SEQ ID NO:43) данные нормализовали относительно эталонной конструкции UFV170090 (SEQ ID NO:3), НА дикого типа В/Brisbane/60/08, в том числе домена тримеризации фолдона. Эталонные конструкции были установлены на 100%.

5 Результаты и вывод

Было возможно введение дополнительных мотивов N-связанного гликозилирования в головной домен полипептидов по настоящему изобретению в положениях 136, 137, 141 или 151 (ФИГ. 3В), и при этом наблюдалось лишь минимальное снижение уровней экспрессии (до ~30% для UFV171472 (SEQ ID NO:43)). Связывание специфических к стеблю (CR9114) и шейке (CR8071) антител сохранялось, в то время как наблюдалось ожидаемое снижение содержания связывающего антитела, специфического по отношению к головному домену SD84. Наибольшее снижение связывания SD84 наблюдалось для полипептидов с введением N-связанного гликана в положение 137 (UFV171472, SEQ ID NO:43) или в положение 151 (UFV171991, SEQ ID NO:45). Связывание головки SD84 было снижено на 40% и 52% соответственно по сравнению с полипептидом без дополнительных участков N-гликозилирования.

20 Пример 4. Определение характеристик модификаций участка связывания рецептора.

Разработанные структуры

Чтобы уменьшить аффинность связывания консервативного рецептора с его природным лигандом сиаловой кислотой и изменить консервативный эпитоп для антител, связывающихся с головкой, в участке связывания рецептора и вокруг него в описанные в данном документе полипептиды вводили точечные замены. В положение 175 вводили альтернативные гидрофобные остатки, тогда как гидрофобные и заряженные остатки оценивали в положениях 219, 257 и 258 (ФИГ. 4А).

Анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, синтезировали так, как описано в примере 2. Полипептиды, включающие в себя метку FLAG-линкер-His, для целей скрининга продуцировались в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл). Экспрессию и сворачивание полипептидов оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примерах 2 и 3. Данные нормализовали относительно эталонной конструкции UFV171990 (SEQ ID NO:41),

представляющей собой стабилизированный НА В/Brisbane/60/08, включающий метку FLAG-линкер-His, которая была установлена на 100%.

Результаты и вывод

По сравнению с эталоном все полипептиды с измененными остатками вблизи или в участке связывания рецептора демонстрировали пониженные уровни экспрессии (ФИГ. 4В). Замены в положениях 219 и 258 были переносимыми меньше всего; UFV172072 (SEQ ID NO:54) и UFV172064 (SEQ ID NO:46) представляли собой полипептиды с самой низкой (11%) и самой высокой (56%) экспрессией. Замены в положениях 175 и 257 воспринимались лучше в отношении экспрессии белка. На полипептиды UFV172073 (SEQ ID NO:55), UFV172075 (SEQ ID NO:57), и UFV172078 (SEQ ID NO:60) оказывали минимальное влияние, и они достигали уровня 75%, 70% и 74% относительно эталона. Точно так же эти три полипептида продемонстрировали самое высокое содержание тримеров – 90%, 89% и 78% соответственно. Кроме того, связывание моноклонального антитела CR9114, связывающего стебель, сохранялось (71-94%), в то время как связывание SD84, специфического по отношению к головному домену, значительно изменялось; UFV172073 (SEQ ID NO:55) связывался с трудом (17%), тогда как UFV172075 (SEQ ID NO:57) демонстрировал резкое увеличение связывания (579%). Для UFV172078 с заменой в положении 175 (SEQ ID NO:60) на связывание SD84 оказывали лишь минимальное влияние (74%).

В целом, замены в участке связывания рецептора не были хорошо переносимыми. Полипептиды, включающие в себя замену 257E, 257V или 175W, продемонстрировали небольшое, но приемлемое снижение уровня экспрессии, содержания тримера и связывания mAb CR9114. Единственная наблюдаемая разница с этими полипептидами заключалась в связывании SD84.

Пример 5. Определение характеристик делеций проксимальной области слитого пептида (FPPR) в полипептидах по настоящему изобретению.

Разработанные структуры

Остатки структурно неопределенной петли после участка расщепления НА₀ в положении 362 обозначали как проксимальную область слитого пептида (FPPR, остатки 369-383, ФИГ. 1А и ФИГ. 5А). Полипептиды, содержащие делецию FPPR различной длины, от 3 до 7 остатков, и положение оценивали с целью повышения стабильности НА и доступности консервативных стеблевых эпитопов.

Анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, синтезировали так, как описано в примере 2. Полипептиды, включающие в себя метку FLAG-линкер-His, для целей скрининга продуцировались в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл). Экспрессию и сворачивание полипептидов оценивали с помощью AlphaLISA, как описано в примерах 2 и 3. Данные нормализовали относительно эталонной конструкции UFV171990 (SEQ ID NO:41), представляющей собой стабилизированный HA B/Brisbane/60/08, включающий метку FLAG-линкер-His, которая была установлена на 100%.

Результаты и вывод

Частичные делеции FPPR не изменяли заметно уровни экспрессии белка (83-110%, ФИГ. 5B). Для двух полипептидов, UFV172680 (SEQ ID NO:63) и UFV172683 (SEQ ID NO:65) наблюдали ~2-кратное снижение образования тримеров, тогда как все другие полипептиды продемонстрировали сходное содержание тримеров по сравнению с эталоном. Более значительные различия наблюдали для связывания стеблевых специфических mAb CR9114. При 24% связывании CR9114 по сравнению с эталоном UFV172690 (SEQ ID NO:69) продемонстрировал самое низкое связывание, что позволило предположить, что делеции за пределами положения 380 не были хорошо переносимыми. UFV172680 (SEQ ID NO:63), UFV172683 (SEQ ID NO:65), и UFV172691 (SEQ ID NO:68) также продемонстрировали снижение связывания CR9114 на 55%, 66% и 74% соответственно по сравнению с эталоном. На связывание mAb CR8071, специфического по отношению к шейке, оказывали лишь минимальное влияние, а относительное связывание находилось в диапазоне от 67% до 104% по сравнению с эталоном. Связывание специфического по отношению к головному домену SD84 продемонстрировало больший разброс в связывании; UFV172683 (SEQ ID NO:65) продемонстрировал с делецией из 7 аминокислот самое низкое связывание (43%), а UFV172686 (SEQ ID NO:66) продемонстрировал самое высокое связывание (167%).

В целом, частичные делеции FPPR переносились хорошо; уровень экспрессии, образование тримера и правильное сворачивание сохранялись или демонстрировали минимальное снижение, даже если из этой высококонсервативной петли было удалено не более 7 аминокислот. Сворачивание CR9114 явно нарушается, в случае если делеции достигают положения 381, которое, по-видимому, находится слишком близко к консервативным стеблевым эпитопам HA. Полипептиды UFV172680 (SEQ ID NO:63) и

10

15

20

Таблица 2. Альтернативные С-концевые усечения полипептидов, полученные из эктодомена НА из В/Brisbane/60/08. "-" указывает на усеченные остатки между положениями 533 и 552. "TM" означает трансмембранный домен. Предполагаемые N-гликановые участки выделены в аминокислотных положениях 533 и 546.

[illegible]

Анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, перечисленные в таблице 2, синтезировали и экспрессировали в клеточных культурах EXPI-293, как описано в примерах 2 и 4. Собранные надосадочные жидкости культур анализировали в отношении наличия экспрессированного тримерного полипептида с помощью аналитической SEC с использованием HPLC, как описано в примере 2.

Результаты и вывод

Анализ надосадочных жидкостей культур с помощью SEC показал наличие одного основного пика (время удерживания ~6,5 минут) для всех протестированных конструкций, который соответствовал тримерной форме полипептида (ФИГ. 6). Наблюдали минимальный эффект альтернативных С-концевых усечений в отношении уровня экспрессии тримерных полипептидов; только незначительное уменьшение высоты пика тримера наблюдали для UFV180461 (SEQ ID NO:78) и UFV180462 (SEQ ID NO:79), ~20% высоты пика по сравнению с эталонным UFV180284 (SEQ ID NO:70). Кроме того, наблюдали постепенное увеличение времени удерживания в эксклюзионной колонке, что коррелировало с уменьшением размера тримера полипептида при поэтапном усечении С-конца. Вероятно, изменение времени удерживания было усилено удалением двух предположительно N-связанных гликозилированных остатков аспарагина в положениях 533 и/или 546.

Таким образом, С-концевые усечения между остатками 533 и 549 полипептидов по настоящему изобретению хорошо переносились, и при этом наблюдали лишь незначительные эффекты в отношении уровней экспрессии тримерных НА вируса гриппа В.

Пример 7. Экспрессия, очистка и определение характеристик *in vitro* тримерных полипептидов по настоящему изобретению.

Разработанные структуры

Чтобы определить характеристики комбинации дополнительных мотивов N-связанного гликозилирования, замен сайта связывания рецептора (RBS) и делеций в проксимальной области слитого пептида, их вводили в стабилизированный НА В/Brisbane/60/08 в отсутствие домена тримеризации фолдон. В полипептиды без введенного мотива N-связанного гликозилирования в положении 136 вводили глутамат (E); UFV180137 (SEQ ID NO:82), UFV180251 (SEQ ID NO:83), и UFV180284 (SEQ ID NO:84). Замену RBS (257E) включали во все полипептиды. Для сравнения,

использовали HA WT B/Brisbane/60/08, в том числе С-концевой домен тримеризации фолдон (UFV170088: SEQ ID NO:80). Все полипептиды были получены в клетках ExpiCHO, в том числе С-метка, кислый пептид (E-P-E-A) с четырьмя остатками, слитый с С-концом полипептидов.

5 Экспрессия и очистка белков

5 Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды, были синтезированы (Genscript) и клонированы в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плазмида pcDNA3 с усиленным промотором CMV). Полипептиды получали в суспензионных клетках ExpiCHO, культивируемых в среде для экспрессии ExpiCHO™, посредством временной
10 трансфекции с помощью соответствующей ДНК промышленного качества (уровень эндотоксина $\leq 0,01$ ЭЕд./мкг и содержание суперспиралей $\geq 90\%$) с использованием реагента для трансфекции ExpiFectamine™ (Gibco, ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. К клеточным культурам через 1 день после трансфекции добавляли стимулятор ExpiFectamine CHO и подпитку ExpiCHO (Gibco,
15 ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Образцы надосадочной жидкости культуры, содержащие секретиремые полипептиды, собирали в день 10 и осветляли с помощью центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтр-насадку на бутылку с размером пор 0,2 мкм (Corning). Полипептиды экспрессировались в среднем масштабе (~70 мл) и большем масштабе (~350 мл).

20 Полипептиды очищали посредством двухстадийного протокола. Вначале собранную и осветленную надосадочную жидкость культуры (крупномасштабная трансфекция) загружали в колонку HiScale 16/20 (GE Healthcare; Чикаго, штат Иллинойс, США), упакованную аффинной смолой (Capture Select; ThermoFisher Scientific), которая состояла из однодоменного антитела, специфического по
25 отношению к С-метке, иммобилизованного на агарозных гранулах (ThermoFisher Scientific). Эта смола обладала высокой специфичностью в отношении связывания белков с С-меткой. Количество внесенного полипептида в собранном надосадочной жидкости культуры определяли с помощью ОСТЕТ (антитело к С-метке) перед очисткой. Элюирование белков с С-меткой проводили с применением TRIS-буфера, содержащего 2 М MgCl₂. На основании УФ-сигнала (A280) элюированные фракции
30 объединяли и фильтровали через фильтровальную мембрану Millex-GV 0,22 мкм (MilliporeSigma; Берлингтон, штат Массачусетс, США). Затем собранный пик элюирования вносили в колонку Superdex 26/60 200 pg (GE Healthcare), уравновешенную подвижным буфером (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8), с целью

доочистки, т. е. для удаления минимального количества мультимерного и мономерного белка. На основании УФ-сигнала (A280) фракции тримера объединяли.

Анализ надосадочной жидкости культуры и очищенного белка

Уровень экспрессированного полипептида в надосадочной жидкости клеточной культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы ОСТЕТ в соответствии с инструкциями производителя (FortéBio; Фримонт, штат Калифорния, США). Сначала строили стандартную кривую с использованием стрептавидиновых биосенсоров (FortéBio), загруженных конъюгатом CaptureSelect™ с биотином и антителом к С-метке (ThermoFisher Scientific), с помощью оценивания сдвига связывания серий разбавлений точно определенной эталонной партии очищенного гомологичного полипептида (стабилизированный HA B/Brisbane/60/08, в том числе С-концевая С-метка; UFV172551 SEQ ID NO:96). Затем измеряли сдвиг связывания предварительно разбавленных (в буфере для кинетического анализа, FortéBio) образцов надосадочных жидкостей клеточных культур, содержащих полипептиды и концентрацию полипептидов рассчитывали с использованием построенной стандартной кривой.

Содержание тримеров полипептидов в надосадочной жидкости культуры и очищенного полипептида оценивали с помощью анализа многоуглового светорассеяния в сочетании с эксклюзионной хроматографией (SEC-MALS) с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) серии Infinity 1260 (Agilent; Санта-Клара, штат Калифорния, США). Прогоняли 40 мкг каждого очищенного полипептида (1 мл/мин) через колонку TSKgel G3000SWxl (Sigma-Aldrich; Сент-Луис, штат Миссури, США) 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.

Антигенность очищенных полипептидов оценивали с помощью ELISA (значения EC₅₀ связывания антител). С этой целью полипептиды покрывали в концентрации 10 нМ и инкубировали с серией разбавлений моноклонального антитела (mAb) CR9114 (которое описано в WO2013/007770), CR8071 (которое описано в Dreyfus et al., 337(6100):1343-8 (2012)), SD84 (которое описано в (Laursen et al., Science 362(6414):598-602 (2018)) и 34B5 (как описано в WO2015/148806). Начальную

концентрацию 70 нМ использовали для CR9114, CR8071 и 34B5, тогда как начальную концентрацию 100 нМ использовали для SD84. Связывание антител определяли посредством инкубации с конъюгированным с HRP вторичным антителом к человеческому Fc (мышинное антитело к человеческому IgG, Jackson ImmunoResearch; Уэст-Гроув, штат Пенсильвания, США) и визуализировали посредством добавления субстрата POD. Считывание проводили с применением многорежимного планшет-ридера EnSight™ (PerkinElmer; Уолтем, штат Массачусетс, США). Значения EC₅₀ рассчитывали с применением программного пакета Spotfire (Tibco Software Inc.; Пало-Альто, штат Калифорния, США).

Термостабильность полипептидов определяли в надосадочной жидкости культуры с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), как описано в примере 2, путем мониторинга флуоресцентной эмиссии красителя Sypro Orange (ThermoFisher Scientific), добавленного к 6 мкг раствора полипептида.

Результаты и вывод

Анализ неочищенной надосадочной жидкости клеточной культуры с помощью SEC-MALS (ФИГ. 7А, левая панель) показал присутствие преимущественно растворимых тримерных полипептидов (время удерживания ~7 минут). Схожий анализ также указывал, что протокол двухстадийной очистки давал на выходе чистый тримерный полипептид (ФИГ. 7А, правая панель). Кроме того, тримерные полипептиды экспрессировались на высоком уровне, как определено с помощью ОСТЕТ; наблюдали не более 2-кратного увеличения по сравнению с эталоном (ФИГ. 7В). Очищенные полипептиды были правильно свернуты, как видно из анализа ELISA, показывающего сильное связывание CR9114 со стеблевым полипептидом (со значениями EC₅₀ в более низком наномолярном диапазоне (< 2,6 нМ)). Аналогично, наблюдали значения EC₅₀ для связывания mAb CR8071, специфического по отношению к шейке. Напротив, не наблюдали какого-либо связывания для связывающего антитела, специфического по отношению к головному домену SD84. Вероятно, введенные мотивы N-связанного гликозилирования были гликозилированы и предотвращали связывание SD84 из-за стерических затруднений со стороны гликановых фрагментов. С помощью DSF определяли температуру, при которой разворачивается 50% полипептида. Все полипептиды были температурно-стабильными и характеризовались значениями T_{m50}, составляющими 68,3°C, 69,2°C, 69,4°C, и 69,3°C, для соответственно UFV180131 (SEQ ID NO:81), UFV180137 (SEQ ID NO:82), UFV180251 (SEQ ID NO:83), и UFV180284 (SEQ ID NO:84). Значение T_{m50} для эталона, НА дикого типа, в том числе

домена тримеризации фолдона, было на $\sim 8,6^{\circ}\text{C}$ ниже, что указывало на то, что комбинация замен и делеций оказывала значительный эффект в отношении температурной стабильности полипептида. Использование альтернативного положения С-концевого усечения и нокаут участка расщепления HA_0 приводили в результате к снижению уровня экспрессии белка; однако каждый полипептид хорошо экспрессировался на высоком уровне, сравнимом с эталонным (ФИГ. 7С). Сворачивание полипептида не было затронуто, и при этом наблюдали значения EC_{50} в нижнем наномолярном диапазоне ($< 4,6 \text{ nM}$) для связывания mAb CR9114, специфического по отношению к стеблю, и mAb CR8071, специфического по отношению к шейке. Подобно тому, что наблюдали для SD84, не наблюдали какого-либо связывания mAb172498 (WO2015/148806), специфического по отношению к головному домену. Вероятно, введенные мотивы N-связанного гликозилирования были гликозилированы и предотвращали связывание mAb 172498 из-за стерических затруднений со стороны гликановых фрагментов. Все полипептиды характеризовались сходными значениями Tm_{50} по сравнению с полипептидами с не подвергнутым мутации участком расщепления и другими положениями усечения.

Таким образом, комбинация стабилизирующих замен и делеции проксимальной области слитого пептида была полезной и давала возможность добавлять ненативные гликаны головного домена и замены в участке связывания рецептора. Полипептиды хорошо экспрессировались, были очищены из надосадочной жидкости клеточной культуры в виде правильно свернутых тримерных полипептидов, были термостабильными и сохраняли в растворе правильное сворачивание HA и тримерную конформацию до слияния.

Пример 8. Экспрессия растворимого стабилизированного HA вируса гриппа В по сравнению с HA дикого типа вируса гриппа В в различных подтипах

Разработанные структуры

В дополнение к полипептидам HA , описанным в примерах 2-7, дополнительно экспрессировали стабилизированные HA вируса гриппа В и сравнивали их с соответствующими растворимыми эктодоменами HA дикого типа. Так, глутамин (Q) в положении 227, изолейцин (I) в положении 238, изолейцин (I) в положении 384, аргинин (R) в положении 461 и изолейцин (I) в положении 476 вводили в аминокислотные последовательности HA четырех дополнительных штаммов вируса

гриппа В: В/Lee/1940, В/Yamagata/16/1988 (линия Yamagata), В/Florida/04/2006 (линия Yamagata) и В/Iowa/06/2017 (линия Victoria). Все полипептиды включали в себя мутацию в виде делеции 372-376 проксимальной области слитого пептида (FPPR), за исключением полипептида, полученного из В/Iowa/06/2017. Через три дня после трансфекции уровни экспрессии полипептидов в надосадочной жидкости клеточной культуры Expi293F сравнивали с соответствующими полипептидами WT без мутаций.

Анализ надосадочной жидкости культуры

Фрагменты ДНК, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, синтезировали, как описано в примере 2. Полипептиды дикого типа, в том числе His-метка, и стабилизированные полипептиды, включающие в себя последовательность распознавания-His-метку линкер-сортазы, для целей скрининга и очистки получали в эукариотической суспензионной клеточной линии Expi293F в микромасштабе (200 мкл).

Уровень экспрессированного полипептида в надосадочной жидкости клеточной культуры оценивали с помощью биослойной интерферометрии с использованием платформы ОСТЕТ (FortéBio). Вкратце, стандартную кривую строили с использованием биосенсоров на основе антител к HIS (HIS2) (FortéBio) посредством измерения сдвига связывания в серии разбавлений строго определенной эталонной партии очищенного сопоставимого полипептида. Затем измеряли сдвиги связывания предварительно разбавленных (в буфере для кинетического анализа, FortéBio) образцов надосадочных жидкостей клеточных культур, содержащих полипептиды по настоящему изобретению, и концентрацию полипептидов рассчитывали с использованием построенной стандартной кривой.

Присутствие экспрессированных полипептидов и их четвертичную структуру (которая указывала, являлся ли полипептид мономером, тримером или мультимером) в надосадочной жидкости культуры оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии с многоугольным светорассеянием (MALS) в установке для ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (UHPLC) с использованием системы Vanquish (ThermoFisher Scientific). Для полипептидов, полученных из В/Lee/40, В/Yamagata/16/1988 и В/Florida/04/2006, использовали колонку ВЕН 200А (вода, вводимый объем 40 мкл, скорость потока 0,35 мл/мин), для В/Iowa/06/2017 использовали полипептид, полученный на колонке Unix-C 300А (Sepax Technologies, вводимый объем 15 мкл, скорость потока 0,1 мл/мин). Элюирование контролировали с

помощью детектора светорассеяния Helios (Wyatt Technologies). SEC-профили анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6 (Wyatt Technology).

Результат и вывод

5 Как и в примере 2, замена на глутамин в положении 227 и изолейцин в положениях 238, 384 и 476, аргинин в положении 461 с делецией FPPR или без нее (остатки 372-376) в НА дикого типа различных штаммов приводила в результате к увеличению экспрессии, как определено с помощью биослойной интерферометрии (ФИГ. 8А). Анализ неочищенной надосадочной жидкости клеточной культуры с
10 помощью SEC-MALS (ФИГ. 8В) продемонстрировал, что при введении стабилизирующих мутаций для всех растворимых стабилизированных НА отчетливый пик тримера (Т) появляется при времени удерживания ~6,5 минуты, что выше, чем пики тримера, наблюдаемые для соответствующих эктодоменов НА дикого типа (ФИГ. 8В). Кроме того, ни один из стабилизированных НА не продемонстрировал пик
15 мономера (М), который появлялся при времени удерживания между 6,5 и 7 минутами для НА дикого типа В/Iowa/06/2017.

Таким образом, данные подтверждают, что введение мутаций 227Q, 238I, 384I, 461R и 476I приводит в результате к повышенной экспрессии и образованию стабильных растворимых тримерных полипептидов НА.

20

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Ambrose et al., Hum. Vaccin. Immunother. 8:81-8 (2012);
 Dijkstra et al., Epidemiol. Infect. 137:473-9 (2009);
 Dopheide TA, Ward CW, *J Gen Virol.* 367-370 (1981);
 25 Dreyfus et al., Science 337(6100):1343-8 (2012);
 Ekiert et al., Science 324:246 (2009);
 Ekiert et al., Science 333: 844 (2011);
 Ferguson et al. (2003), Nature 422: 428-443 (2003);
 Grohskopf et al., MMWR Recomm. Rep. 66:1-20 (2017);
 30 Grohskopf et al., MMWR Recomm. Rep. 67:643-5 (2018);
 Krammer et al., Nat. Rev. Disease Primers 4:3 (2018);
 Laursen et al., Science 362(6414):598-602 (2018);
 Lorieau et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 11341 (2010);
 Ni et al., Virology 450-451:71-83 (2014);

- Peltola et al., Clin. Infect. Dis. 36:299-305 (2003);
 Steven et al., Science 303: 1866 (2004);
 Steven et al., Science 312: 404 (2006);
 Thompson et al., JAMA 292:1333-40 (2004);
 5 Thompson et al., JAMA 289:179-86 (2003);
 Throsby et al. (2008), Plos One 12(3): 1-15 (2008);
 Wilson et al (1981) Nature 289: 366 (1981);
 Центры США по контролю и профилактике заболеваний, "Seasonal influenza activity
 surveillance reports 2001-2018" www.cdc.gov/flu/weekly/pastreports.htm (по состоянию на
 10 2 июля 2018 года);
 Европейский центр профилактики и контроля заболеваний/Региональное европейское
 бюро ВОЗ, "Annual epidemiological reports on seasonal influenza 2001-2018,"
ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/aer (по состоянию на 2
 июля 2018 года);
 15 Всемирная организация здравоохранения, "Recommended composition of influenza virus
 vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season,"
www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en (по состоянию
 на 2 июля 2018 года).
 WO2008/028946
 20 WO2010/130636
 WO2013/007770
 WO2015/148806

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИSEQ ID NO 1: Полноразмерный В/Brisbane/60/08

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPCKTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 5 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
 10 LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLMIAIFVVMVSRDNVSCSICL

SEQ ID NO 2: UFV180846

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPCKTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINATNAPGGPY
 15 NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFEGMI
 AGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
 SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFS LPTFD
 20 SLNITAEPEA

SEQ ID NO 3: UFV170090

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPCKTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 25 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
 30 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 4: UFV171700

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPCKTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 35 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
 40 ADTISSQIELMVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFS

LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 5: UFV171701

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELLVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

15 **SEQ ID NO 6: UFV171702**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
20 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

25

SEQ ID NO 7: UFV171703

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
30 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
35 GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 8: UFV171741

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
40 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK

SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 5 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 9: UFV170519

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 10 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QQFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 15 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 10: UFV170520

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 20 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QNFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 25 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 11: UFV170521

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 30 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QFFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 35 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 12: UFV170522

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 5 QIFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 10 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 13: UFV170523

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 15 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QYFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 20 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 14: UFV170515

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 25 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 30 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 15: UFV170516

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 35 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 40 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS

LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 16: UFV170517

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

15 **SEQ ID NO 17: UFV170518**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTIFYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
20 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

25 **SEQ ID NO 18: UFV170524**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
30 QQFTSSANGVTTNYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
35 GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 19: UFV170525

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
40 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG

SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 5 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 20: UFV170541

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 10 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 15 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 21: UFV170542

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 20 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWFGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 25 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 22: UFV170543

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 30 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 35 WEGMIAGWNGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 23: UFV170544

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 5 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWQGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 10 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 24: UFV170545

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 15 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 20 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 25: UFV170546

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 25 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 30 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEWLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 26: UFV170547

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 35 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKSPPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 40 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEFLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS

LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 27: UFV170548

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEI LELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEYLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

15 **SEQ ID NO 28: UFV170549**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
20 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEI LELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

25 **SEQ ID NO 29: UFV170550**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
30 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVK TPLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEI LELDEKVDDL R
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDENLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGS LPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
35 GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 30: UFV170551

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPI MHDR TKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
40 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIK

SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEQLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 5 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 31: UFV170552

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 10 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWWGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEWLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 15 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 32: UFV170553

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 20 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWWGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 25 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEFL LALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 33: UFV170554

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 30 KIGTSGSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNLSKPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 35 WEGMIAGWFGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEWLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 34: UFV170555

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 5 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWWGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEYLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 10 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 35: UFV170556

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 15 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 20 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 36: UFV170557

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 25 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWNGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 30 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDENLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITASGSLVPRGSGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
 GSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 37: UFV170558

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 35 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
 KIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 40 WEGMIAGWQGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
 ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEQLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCILDRIAAGTFDAGEFS

LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 38: UFV170559

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWNGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEQLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

15 **SEQ ID NO 39: UFV171348**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
20 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLND DGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

25 **SEQ ID NO 40: UFV171387**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
30 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLND DGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

35 **SEQ ID NO 41: UFV171990**

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
40 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 42: UFV171993

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 43: UFV171472

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGSLPETGGGSDYKDDDDKGGGSGG
GGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 44: UFV171992

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
30 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 45: UFV171991

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINAENAPGGPY
NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
40 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 46: UFV172064

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKFYGD SKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 47: UFV172065

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAK WYGD SKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 48: UFV172066

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKYYGD SKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 49: UFV172067

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKRYGD SKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 50: UFV172068

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKEYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 51: UFV172069

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQEGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 52: UFV172070

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQDGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 53: UFV172071

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQVGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 54: UFV172072

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQFGRI VVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 55: UFV172073

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 56: UFV172074

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPD SGRI VVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 57: UFV172075

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPVSGRI VVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 58: UFV172076

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPFSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 59: UFV172077

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAFPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 60: UFV172078

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAWPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 61: UFV172079

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAYPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 62: UFV172678

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMI
10 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 63: UFV172680

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLGMI
20 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 64: UFV172681

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEIA
30 GWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISS
QIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDS
LNITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 65: UFV172683

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTS GCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFMIAG
40 WIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTISSQ

IELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL
NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 66: UFV172686

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGM
10 IAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTI
SSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTF
DSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 67: UFV172687

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEEG
20 MIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTI
ISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPT
FDSL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 68: UFV172691

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTI
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SL NITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 69: UFV172690

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPY
KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
40 WG WIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTI
S

SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIAAADYKDDDDKPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 70: UFV180284

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIEPEA

SEQ ID NO 71: UFV180454

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTI

SEQ ID NO 72: UFV180455

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLDNH

SEQ ID NO 73: UFV180456

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDGLD

SEQ ID NO 74: UFV180457

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLR
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLNDDG

SEQ ID NO 75: UFV180458

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLR
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASLND

SEQ ID NO 76: UFV180459

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLR
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITAASL

SEQ ID NO 77: UFV180460

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLC PKCLNC
TDL DVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNI TNNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKG
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
40 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLR

ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSLNI

SEQ ID NO 78: UFV180461

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
10 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSLNI

SEQ ID NO 79: UFV180462

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
20 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL

SEQ ID NO 80: UFV170088

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINAEANAPGGPY
KIGTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QKFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
30 WEGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL
ADTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
LPTFDSL NITASGSLVPRGSGSGYIPEAPRDQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO 81: UFV180131

35 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMI
40 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS

SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIEPEA

SEQ ID NO 82: UFV180137

5 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMI
10 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIEPEA

SEQ ID NO 83: UFV180251

15 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
20 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAASLNDDGLDNHTIEPEA

SEQ ID NO 84: UFV180846

25 MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
TDLVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINATNAPGGPY
NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIK
SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFEGMI
30 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
SLNITAEPEA

SEQ ID NO 85: HIS-метка

35 HHHHHH

SEQ ID NO 86: HIS-метка

HHHHHHH

40 **SEQ ID NO 87: Домен тримеризации**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO 88: FLAG-метка

DYKDDDDK

SEQ ID NO 89: Участок протеолитического расщепления фактором X

IEGR

SEQ ID NO 90: Участок протеолитического расщепления тромбином

LVPRGS

SEQ ID NO 91: UFV180847

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
 NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFEGMI
 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
 SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERK LKKMLGPSAVEI GNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
 SLNITAEPEA

SEQ ID NO 92: UFV180848

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
 NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
 AGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL RADTIS
 SQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERK LKKMLGPSAVEI GNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFSLPTFD
 SLNITAEPEA

SEQ ID NO: 93 UFV180849

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPY
 NITTS GSCPNITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKG
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTP LKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDL R
 ADTISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERK LKKMLGPSAVEI GNGCFETKHKCNQTC LDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITAEPEA

SEQ ID NO 94: Линия Yamagata (B/Florida/04/06)

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPDCLNC
 TDLDVALGRPMC VGTTPSAKASILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPY
 RLGTSGSCP NATSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDDKTQMKNLYGDSNPQ
 5 KFTSSANGVTTHYVSQIGSFDPQTEDGGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGW
 EGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRA
 DTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSL
 PTFDSL NITAASLNDDGLDNHTILLYSTAASSLAVTLM LAIFIVYMVSRDNVSCSICL

SEQ ID NO 95: Консенсусная последовательность

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTE TRGKLCPDCLNC
 TDLDVALGRPMC VGTTPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTQNVIDAEKAPGGPY
 RLGTSGSCP NATSKNGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNKTQMKKLYGDSNPQ
 15 KFTSSANGVTTHYVSQIGGFPDQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKVCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGW
 EGMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRA
 DTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSL
 PTFDSL NITAASLNDDGLDNHTI

SEQ ID NO 96: UFV172551

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSTHNVINATNAPGGPY
 NITTS GSCP NITNGNGFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKP
 25 QQFTSSANGVTTIYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGS
 SLPLIGEADCLHEKYGGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGG
 WEGMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRA
 ADTSSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFS
 LPTFDSL NITAASLNDDGLDNHTIGGSEPEA

SEQ ID NO 97: UFV180846-секретированная

DRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTE TRGKLCPKCLNCTDLDVALGRPKCTGK
 IPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSNHTVINATNAPGGPYNITTS GSCP NITNGN
 GFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQQFTSSANGVTTIYV
 35 SQIGGFNPQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGS LPLIGEADCLHEKY
 GGLNKS KPYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKEQGGFFGAIAGFEGMIAGWIGYTSHGAHGA
 VAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRA DTISSQIELRVLLSNEGIIN
 NSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSL NITA

SEQ ID NO 98: UFV180847-секретированная

DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDVALGRPCKTGK
 IPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPYNITTSGSCPNTNGN
 GFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQQFTSSANGVTTIYV
 5 SQIGGFPNQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKY
 GGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFEGMIAGWIGYTSHGAHVA
 VAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELRVLLSNEGII
 NSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTA

SEQ ID NO 99: UFV180848-секретированная

DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDVALGRPCKTGK
 IPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPYNITTSGSCPNTNGN
 GFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQQFTSSANGVTTIYV
 10 SQIGGFPNQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKY
 GGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGGAGWIGYTSHGAHVA
 15 VAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELRVLLSNEGII
 NSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTA

SEQ ID NO 100: UFV180949-секретированная

DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNCTDLDVALGRPCKTGK
 IPSARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHIRLSEHNVINATNAPGGPYNITTSGSCPNTNGN
 GFFATMAWAVPKNDKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQQFTSSANGVTTIYV
 20 SQIGGFPNQTEDGGLPESGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKY
 GGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKEQGFFGAIAGFLEGGWEGMIAGWIGYTSHG
 25 AHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQIELRVLLS
 NEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFDAGEFSLPTFDSLNTA

SEQ ID NO 101: UFV180567

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPCNCFNC
 30 TDLDVALGRPCKMGNIIPSAKVSILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSNVINAETAPGGPY
 KVGTSGSCPNNANRNGFFNTMAWVPIKDNKNKTAINPVTVEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQ
 KFTSSANGVTTHYVSQIGGFPNQTEDEGLKQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQKVCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGW
 EGMIAGWHGYTSHGAHVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMNGLHDEILELDEKVDDLRA
 35 DTISSQIELAVLLSNEGIIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSL
 PTFDSLNTAHHHHH

SEQ ID NO 102: UFV180566

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPCNCFNC
 40 TDLDVALGRPCKMGNIIPSAKVSILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTSNVINAETAPGGPY
 KVGTSGSCPNNANRNGFFNTMAWVPIKDNKNKTAINPVTVEVPYICSEGEDQITVWGFHSDDKTQMERLYGDSNPQ

QFTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDEGLKQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGILLPQKQVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMIA
 GWIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMNGLHDEILELDEKVDDLADTSS
 QIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGDFSLPTFDS
 5 LNITASGSLVPSGSLPETGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 103: UFV180565

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTRGKLCPCNCLNC
 TDLDVALGRPMCMTIPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTHNVINAERAPGGPY
 10 RLGTSGSCPNTSRNGFFATMAWAVPRDNKTATNPLTVEVPYICTKGEDQITVWGFHSDDKTQMKNLGDSNPQK
 FTSSANGVTTHYVSQIGDFNPQTEDEGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKQVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
 GMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLAD
 TISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLP
 15 TFDSLNITAHHHHHH

SEQ ID NO 104: UFV180400

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTRGKLCPCNCLNC
 TDLDVALGRPMCMTIPSAKASILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTHNVINAERAPGGPY
 20 RLGTSGSCPNTSRNGFFATMAWAVPRDNKTATNPLTVEVPYICTKGEDQITVWGFHSDDKTQMKNLGDSNPQQ
 FTSSANGVTTHYVSQIGDFNPQTEDEGLPQSGRIVVDYMVQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKQVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMIAG
 WIGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTSSQ
 IELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVDIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSLPTFDL
 25 NITASGSLVPSGSLPETGGGSHHHHHH

SEQ ID NO 105: UFV180571

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNC
 TDLDVALGRPMCMTIPSAKASILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPY
 30 RLGTSGSCPNTSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDDKTQMKNLGDSNPQ
 KFTSSANGVTTHYVSQIGSFPDQTEDEGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKQVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPKLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGW
 EGMIAGWHGYTSHGAHGVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLRA
 DTISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHKCNQTCLDRIAAGTFNAGEFSL
 35 PTFDSLNTAHHHHHH

SEQ ID NO 106: UFV180570

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSYFANLKGTRTRGKLCPCDCLNC
 TDLDVALGRPMCMTIPSAKASILHEVKPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYENIRLSTQNVIDAEKAPGGPY
 40 RLGTSGSCPNTSKSGFFATMAWAVPKDNNKNATNPLTVEVPYICTEGEDQITVWGFHSDDKTQMKNLGDSNPQ
 QFTSSANGVTTHYVSQIGSFPDQTEDEGLPQSGRIVVDYMMQKPGKTGTIVYQRGVLLPQKQVWCASGRSKVIKGS

LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFEGMIA
 GWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLADTISS
 QIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCILDRIAAGTFNAGEFSLPTFDS
 LNITASGSLVPSGSLPETGGGSHHHHHH

5

SEQ ID NO 107: UFV190909

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHVRLSTHNVINAEGAPGGPY
 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVDPKNKTATNPLTIEVPYVCTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQK
 FTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
 GMIAGWHGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLAD
 TISSQIELAVLLSNEGIINSEDEHLLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDKIAAGTFDAGEFSLP
 TFDNLNITAHHHHHH

10

15

SEQ ID NO 108: UFV190521

MKAIIVLLMVVTSNADRICTGITSSNSPHVVKTATQGEVNVTVGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGKLCPKCLNC
 TDLDVALGRPKCTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIIMHDRTKIRQLPNLLRGYEHVRLSTHNVINAEGAPGGPY
 KIGTSGSCPNI TNNGFFATMAWAVDPKNKTATNPLTIEVPYVCTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQQ
 FTSSANGVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKVWCASGRSKVIKGS
 LPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKTPCLKLANGTKYRPPAKLLKERGFFGAIAGFLEGGWE
 GMIAGWIGYTSHGAHGVAVAADLKSTQEAINKITKNLNSLSELEVKNLQRLSGAMDELHNEILELDEKVDDLAD
 TISSQIELRVLLSNEGIINSEDEILLALERKLLKMLGPSAVEIGNGCFETKHHCNQTCLDKIAAGTFDAGEFSLP
 TFDNLNITASGSLPETGGGSHHHHHH

20

25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа, содержащий по меньшей мере две стабилизирующие мутации в полипептиде, где стабилизирующие мутации предусматривают мутации по типу замены в

- a. аминокислотных положениях 227 и/или 238 и/или
- b. аминокислотных положениях 384 и/или 476,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

2. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 1, где

- a. аминокислота в аминокислотном положении 227 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, N, F, I и Y, и/или аминокислота в аминокислотном положении 238 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из N, Q, I и F; и/или
- b. аминокислота в аминокислотном положении 384 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, N, Q и I, и/или аминокислота в аминокислотном положении 476 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из W, F, Y, I, N и Q.

3. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 2, где

- a. аминокислота в аминокислотном положении 227 заменена на Q и аминокислота в аминокислотном положении 238 заменена на I; и/или
- b. аминокислота в аминокислотном положении 384 заменена на I и аминокислота в аминокислотном положении 476 заменена на I.

4. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащий одну стабилизирующую мутацию в полипептиде, где стабилизирующая мутация представляет собой замену в аминокислотном положении 461, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению в SEQ ID NO:1.

5. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 4, где аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из M, L, W, Y и R.

5 6. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 5, где аминокислота в аминокислотном положении 461 заменена на R.

7. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 3, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:39, или SEQ ID NO:40.

8. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 6, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO: 108.

9. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный гликановый мотив в головном домене полипептида.

10. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 9, где гликановый мотив содержит замену в мотиве аминокислотного-связанного гликозилирования в по меньшей мере одном аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:

- 25 а. 136 или 137,
- б. 141, и
- с. 151,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

11. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 10, где гликановый мотив содержит замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 136 и 141, 136 и 151, 137 и 141, 137 и 151 или 141 и 151.

12. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 11, где гликановый мотив содержит замену в мотиве N-связанного гликозилирования в аминокислотных положениях 141 и 151.
- 5 13. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 10, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, или SEQ ID NO:45.
- 10 14. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-13, дополнительно содержащий мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде.
- 15 15. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 14, где мутация в участке связывания рецептора предусматривает замену в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:
- 20 a. 175,
b. 219,
c. 257, и
d. 258,
- где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.
- 25 16. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 15, где
- 30 a. аминокислота в 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y;
b. аминокислота в 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E;
c. аминокислота в 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или
d. аминокислота в 258 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F.

17. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 16,
где
 - a. аминокислота в 175 заменена на W,
 - b. аминокислота в 219 заменена на E,
 - 5 c. аминокислота в 257 заменена на E или
 - d. аминокислота в 258 заменена на E.

18. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 17,
где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную
10 последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:55, или
SEQ ID NO:61.

19. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому
из пп. 14-18, где полипептид дополнительно содержит аминокислотную замену в
15 положении 136, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному
положению из SEQ ID NO:1.

20. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому
из пп. 1-19, дополнительно содержащий мутацию в виде делеции проксимальной
20 области слитого пептида (FPPR).

21. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 20,
где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию от по меньшей мере трех
до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями 369 и 382,
25 где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID
NO:1.

22. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 21,
где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из группы,
30 состоящей из Δ 372-376, Δ 372-378, Δ 373-377, Δ 373-376, Δ 374-379, Δ 374-376, Δ 376-380,
и Δ 377-381.

23. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 22, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из Δ372-376 или Δ376-380.
- 5 24. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 23, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.
- 10 25. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-24, где мутантный полипептид гемагглютинаина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, или SEQ ID NO:106.
- 15 26. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа, содержащий мутацию в виде делеции проксимальной области слитого пептида (FPPR), где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию от по меньшей мере трех до семи аминокислотных остатков между аминокислотными положениями 369 и 382, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID
- 20 NO:1.
27. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 26, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из группы, состоящей из Δ372-376, Δ372-378, Δ373-377, Δ373-376, Δ374-379, Δ374-376, Δ376-380, и Δ377-381.
- 25 28. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 26 или п. 27, где мутация в виде делеции FPPR предусматривает делецию, выбранную из Δ372-376 или Δ376-380.
- 30 29. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 28, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:62 или SEQ ID NO:68.

30. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа, содержащий мутацию в участке связывания рецептора в полипептиде, где мутация в участке связывания рецептора предусматривает мутацию по типу замены в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из:

- 5 a. 175,
 b. 219,
 c. 257, и
 d. 258,

где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

31. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 30, где

- 15 a. аминокислота в 175 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W и Y;
 b. аминокислота в 219 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из F, W, Y, R и E;
 c. аминокислота в 257 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V, F; или
20 d. аминокислота в 258 заменена на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из E, D, V и F.

32. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 31, где

- 25 a. аминокислота в 175 заменена на W,
 b. аминокислота в 219 заменена на E,
 c. аминокислота в 257 заменена на E или
 d. аминокислота в 258 заменена на E.

30 33. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 32, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:55, или SEQ ID NO:61.

34. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 30-33, где полипептид дополнительно содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении 136, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID NO:1.

5

35. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1 до 17, 19 до 23, 26 до 28, 30 до 32, или 34, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа содержит гетерологичный домен тримеризации.

10 36. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-34, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит карбокси-(С)-концевое усечение, начинающееся в аминокислотном положении от аминокислотного положения 532 до аминокислотного положения 549, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному положению из SEQ ID
15 NO:1.

37. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 36, где С-концевое усечение начинается в аминокислотном положении 532, 534, 536, 539, 541, 543, 545, 547, или 549.

20

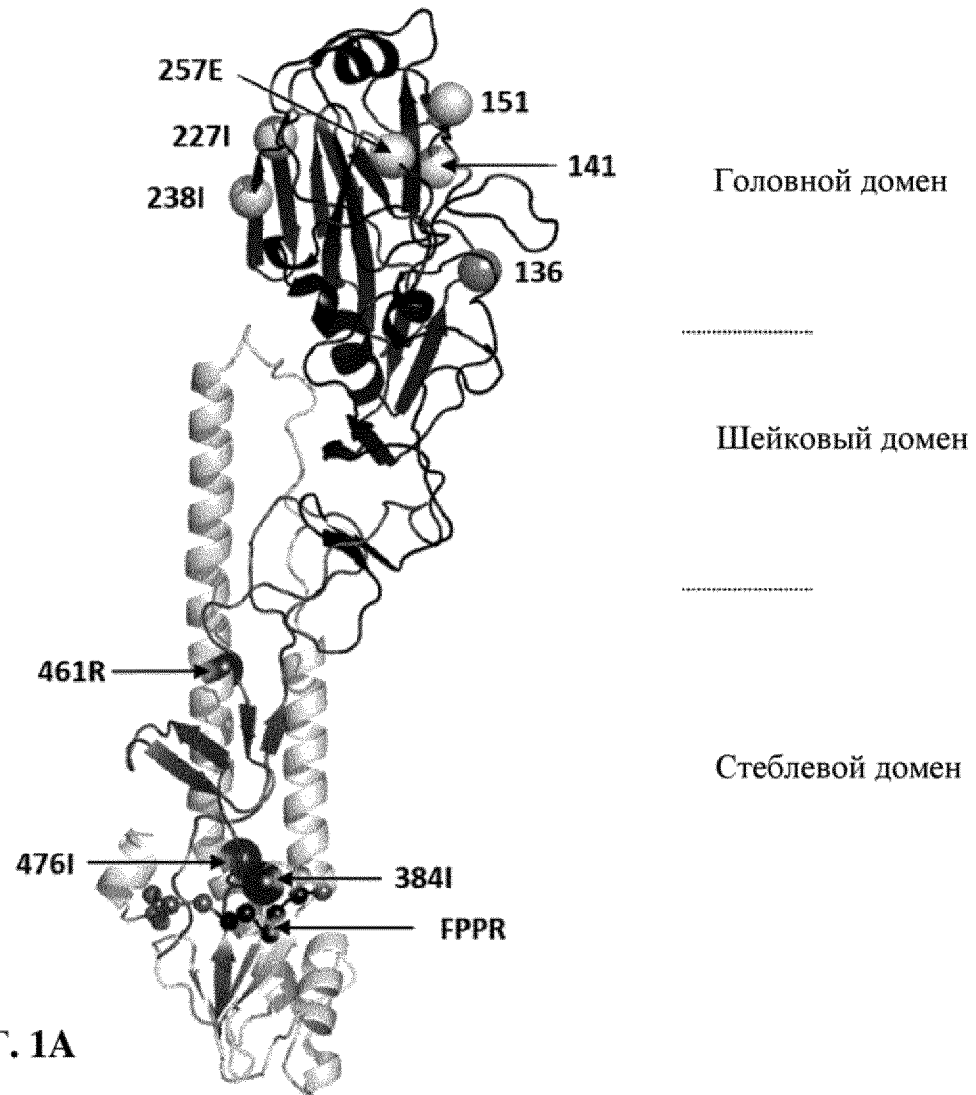
38. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-37, где мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа дополнительно содержит аминокислотную замену в участке расщепления в аминокислотном положении 362, где аминокислотное положение соответствует аминокислотному
25 положению из SEQ ID NO:1.

39. Выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по п. 38, где аминокислота в аминокислотном положении 362 заменена на Q.

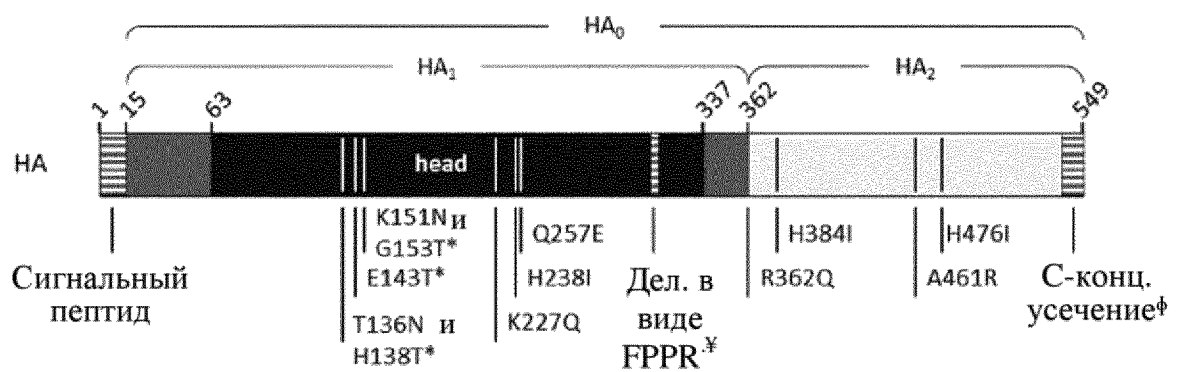
30 40. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный мутантный полипептид гемагглютинаина вируса гриппа по любому из пп. 1-39.

41. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 40.

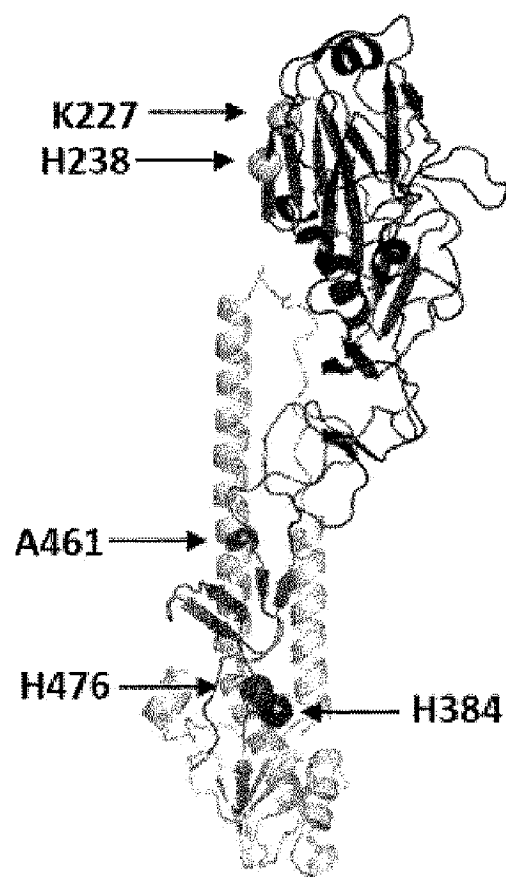
42. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 41.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный мутантный полипептид гемагглютинина вируса гриппа по любому из пп. 1-39 и фармацевтически приемлемый носитель.
44. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 40.
45. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по п. 41.
46. Способ индуцирования иммунного ответа против вируса гриппа у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по любому из пп. 43-45.
47. Способ получения выделенного мутантного полипептида гемагглютинина вируса гриппа, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 42 в условиях, способных обеспечивать продуцирование мутантного полипептида гемагглютинина вируса гриппа, и извлечение мутантного полипептида гемагглютинина вируса гриппа из клетки или культуры.
48. Способ получения фармацевтической композиции по п. 43, при этом способ включает объединение выделенного мутантного полипептида вируса гриппа с фармацевтически приемлемым носителем.



ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



ФИГ. 2А

461	ID.	CR9114 (%)
-	UFV170090	100
M	UFV171700	137
L	UFV171701	107
W	UFV171702	61
Y	UFV171703	90
R	UFV171741	281

ФИГ. 2В

227	238	ID.	CR9114 (%)
-	-	UFV170090	100
Q	-	UFV170519	145
N	-	UFV170520	145
F	-	UFV170521	141
I	-	UFV170522	128
Y	-	UFV170523	136
-	N	UFV170515	85
-	Q	UFV170516	87
-	I	UFV170517	108
-	F	UFV170518	102
Q	N	UFV170524	124
Q	I	UFV170525	245

Символ “-” означает, что остаток WT сохраняется в указанном положении

ФИГ. 2С

ФИГ. 2D

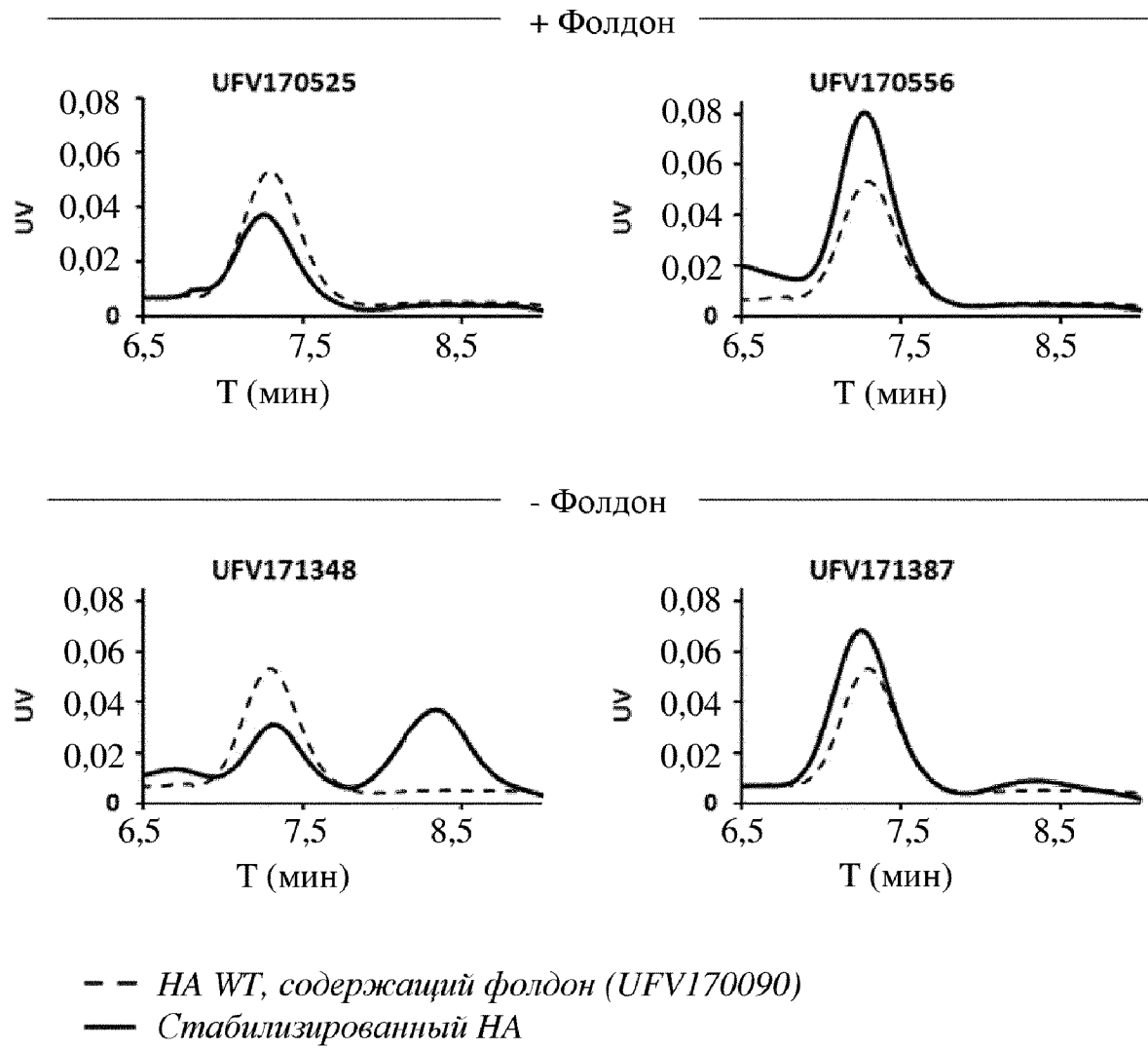
384	476	ID.	CR9114 (%)
-	-	UFV170090	100
W	-	UFV170541	21
F	-	UFV170542	35
N	-	UFV170543	31
Q	-	UFV170544	21
I	-	UFV170545	24
-	W	UFV170546	80
-	F	UFV170547	94
-	Y	UFV170548	114
-	I	UFV170549	72
-	N	UFV170550	141
-	Q	UFV170551	125
W	W	UFV170552	9
W	F	UFV170553	12
F	W	UFV170554	32
W	Y	UFV170555	12
I	I	UFV170556	231
N	N	UFV170557	35
Q	Q	UFV170558	61
N	Q	UFV170559	53

227	238	384	476	Фолдон	ID.	Экспрессия (%)	CR9114 (%)	Температурная стабильность, Tm ₅₀ , (°C)
-	-	-	-	+	UFV170090	100	100	59,5
Q	I	-	-	+	UFV170525	88	143	63,4
-	-	I	I	+	UFV170556	139	229	59,0
-	-	I	I	-	UFV171348	244	78	58,3
Q	I	I	I	-	UFV171387	212	173	64,7

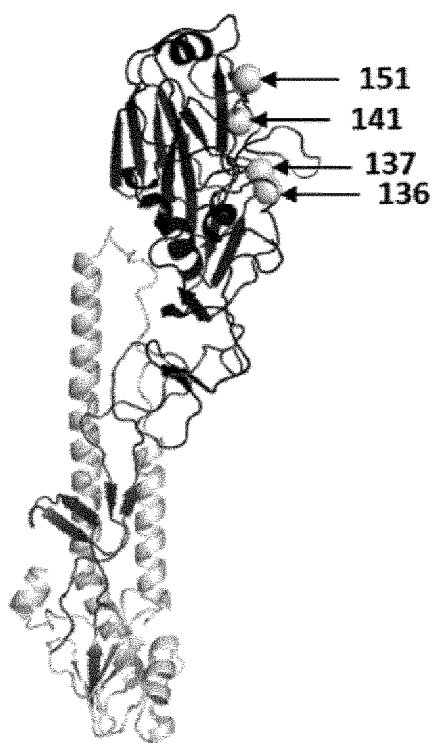
Символ “-” означает, что остаток дикого типа сохраняется в указанном положении.

Символ “+” означает, что присутствует С-концевой домен тримеризации фолдон.

ФИГ. 2E



ФИГ. 2F



ФИГ. 3А

136	137	141	151	ID.	Экспрессия (%)	Тример (%)	CR9114 (%)	CR8071 (%)	SD84 (%)
-	-	-	-	UFV171990	100	100	100	100	100
+	-	-	-	UFV171993	100	93	96	94	80
-	-	+	-	UFV171992	88	92	86	82	75
-	-	-	+	UFV171991	92	104	90	86	48
-	-	-	-	UFV170090 ^F	100	100	100	100	100
-	+	-	-	UFV171472 ^F	69	88	119	104	60

“-” символ, который означает, что остаток дикого типа сохраняется в указанном положении

“+” символ, который означает присутствие N-связанного гликанового мотива в указанном положении

“F” символ, который означает присутствие домена тримеризации фолдона

ФИГ. 3В



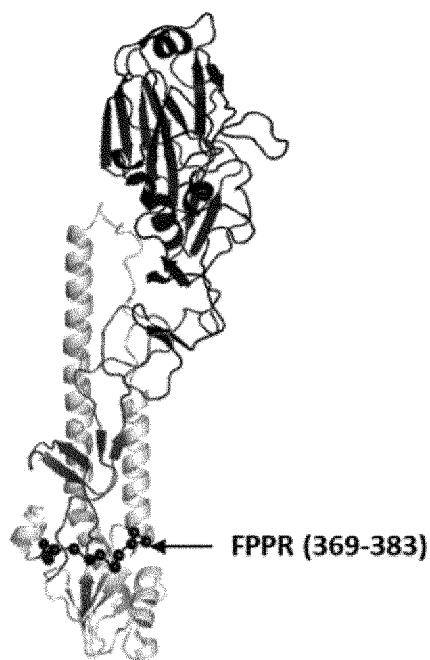
ФИГ. 4А

175	219	257	258	ID.	Экспрессия (%)	Тример (%)	CR9114 (%)	SD84 (%)
-	-	-	-	UFV171990	100	100	100	100
-	F	-	-	UFV172064	56	42	56	53
-	W	-	-	UFV172065	43	32	33	189
-	Y	-	-	UFV172066	55	31	43	63
-	R	-	-	UFV172067	25	22	35	49
-	E	-	-	UFV172068	27	18	31	44
-	-	-	E	UFV172069	34	32	39	45
-	-	-	D	UFV172070	29	19	33	41
-	-	-	V	UFV172071	45	4	21	18
-	-	-	F	UFV172072	11	59	76	82
-	-	E	-	UFV172073	75	90	88	17
-	-	D	-	UFV172074	55	43	56	27
-	-	V	-	UFV172075	70	89	94	579
-	-	F	-	UFV172076	36	15	41	30
F	-	-	-	UFV172077	62	66	59	78
W	-	-	-	UFV172078	74	78	71	56
Y	-	-	-	UFV172079	42	26	36	74

“-” символ, который означает, что остаток дикого типа сохраняется в указанном положении

ФИГ. 4В

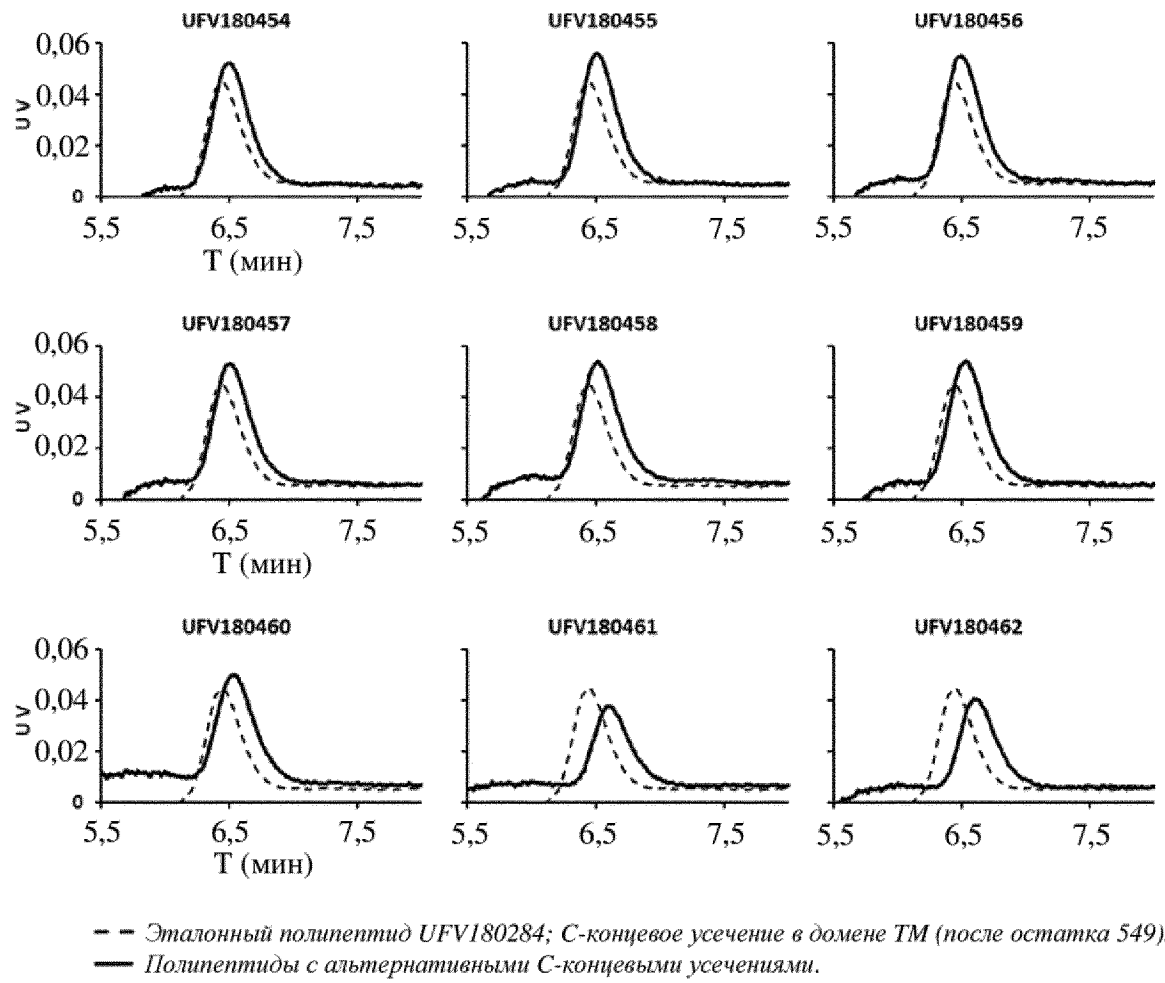
ФИГ. 5А



369	FPPR ...	383	ID.	Экспрессия (%)	Тример (%)	CR9114 (%)	CR8071 (%)	SD84 (%)
AGFLEGGWEGMIAGW			UFV171990	100	100	100	100	100
AGF-----EGMIAGW			UFV172678	103	109	115	97	114
AGFL-----GMIAGW			UFV172680	83	51	55	67	54
AGFLE-----IAGW			UFV172681	111	92	90	91	86
AGF-----MIAGW			UFV172683	98	55	66	68	43
AGFL----EGMIAGW			UFV172686	96	100	97	104	167
AGFLE---EGMIAGW			UFV172687	102	101	100	102	136
AGFLEGG-----AGW			UFV172691	110	108	74	97	145
AGFLEGGW-----GW			UFV172690	107	117	24	101	147

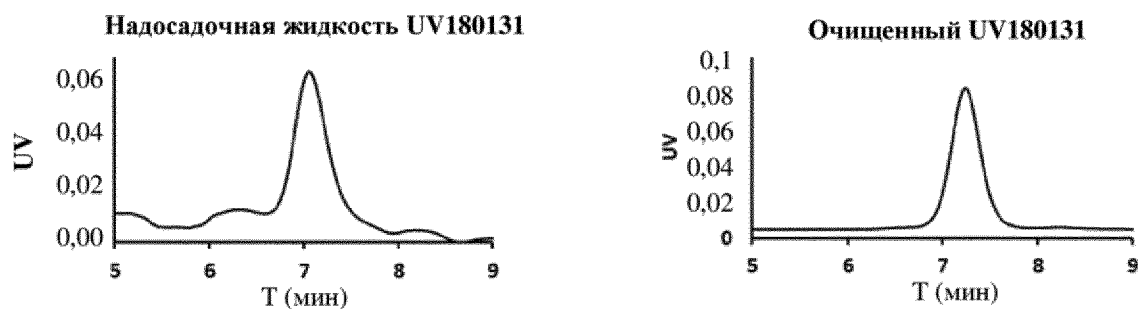
Символ "---" означает делецию соответствующего количества остатков дикого типа в данных положениях

ФИГ. 5В



ФИГ. 6

ФИГ. 7А



ФИГ. 7В

N-связанный гликановый мотив			Стабилизирующие мутации	RBS 257	Делеция в виде FPPR	ID.	Экспрессия (мг/л)	CR9114 EC ₅₀ (нМ)	CR8071 EC ₅₀ (нМ)	SD84 EC ₅₀ (нМ)	Темп. стабильность, Tm ₅₀ (°C)
136	141	151									
-	-	-	-	-	-	UFV170088	270	0,6	0,4	12,9	59,7
+	+	+	+	E	372-376	UFV180131	541	1,5	1,1	n.b.	68,3
E	+	+	+	E	372-376	UFV180137	580	1,5	1,0	n.b.	69,2
E	+	+	+	E	376-380	UFV180251	605	2,6	0,8	n.b.	69,4
E	+	+	+	E	376-380	UFV180284	378	2,0	1,0	n.b.	69,3

“+” означает присутствие N-связанного гликанового мотива в указанных положениях (136, 141 и 151) и присутствие стабилизирующих мутаций (K277Q, H238I, H384I, A461R и H476I), а также мутации в участке связывания рецептора (Q257E).

“-” означает символ, который означает, что остаток дикого типа сохраняется в указанном положении.

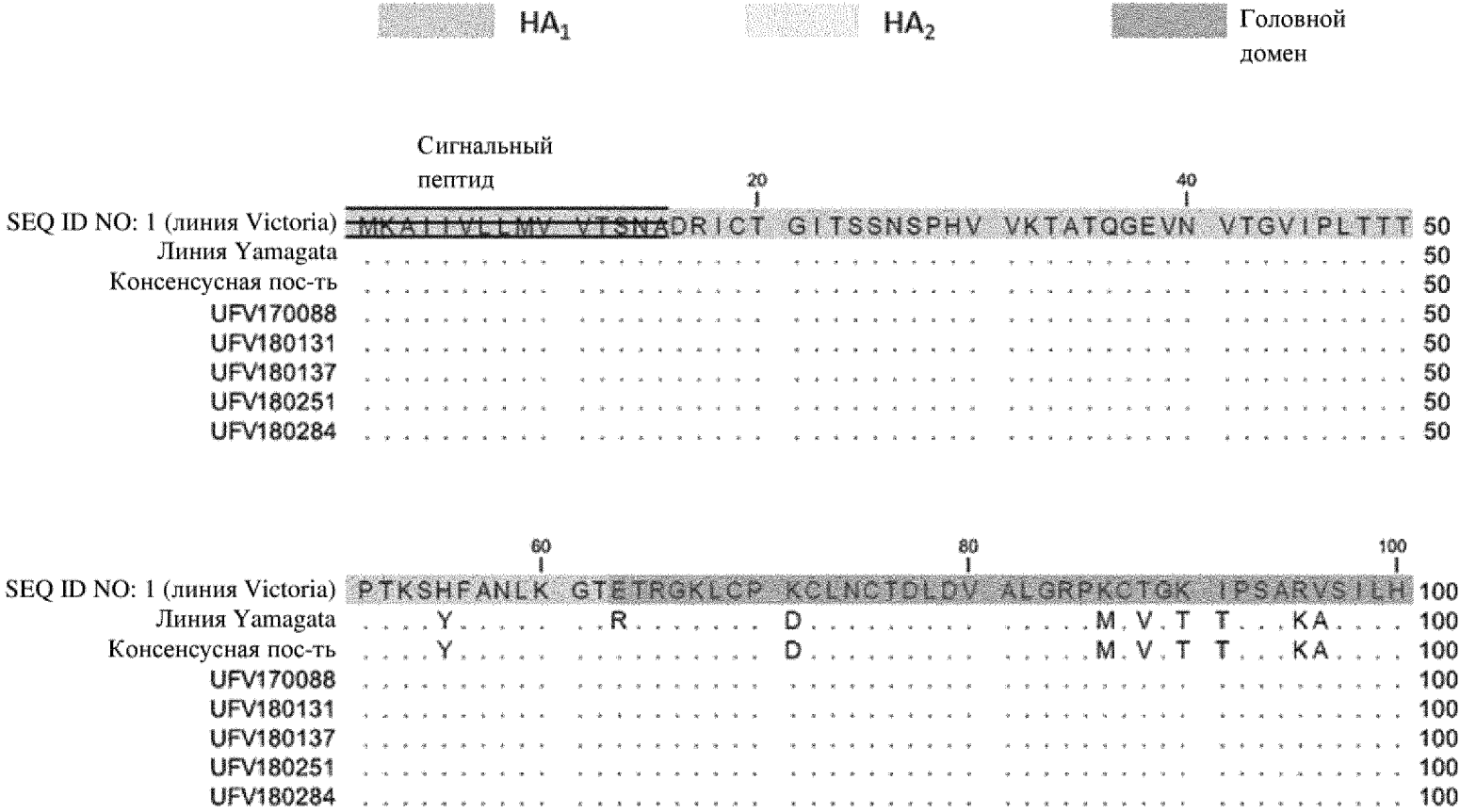
“n.b.” означает, что не наблюдали связывания.

ФИГ. 7С

ID исходной молекулы	C-концевое усечение	Нокаут участка расщепления	ID.	Экспрессия (мг/л)	CR9114 EC ₅₀ (нМ)	CR8071 EC ₅₀ (нМ)	mAb172498 EC ₅₀ (нМ)	Темп. стабильность, Tm ₅₀ (°C)
UFV180131	532-585	R362Q	UFV180846	325	1,8	3,8	n.b.	68,3
UFV180137	532-585	R362Q	UFV180847	384	1,4	3,5	n.b.	69,3
UFV180251	532-585	R362Q	UFV180848	253	4,6	4,1	n.b.	69,3
UFV180284	532-585	R362Q	UFV180849	271	2,9	4,6	n.b.	69,2

“n.b.” означает, что не наблюдали связывания.

Фиг. 7D



SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	EVRPVTSGCF PIMHDKTKIR QLPNLLRGYE HIRLSTHNV I NAENAPGGPY	150
Линия Yamagata	..K.....N.....Q.....D..K.....	150
Консенсусная пос-ть	Q.....D..K.....	150
UFV170088		150
UFV180131	N.T.....T.....	150
UFV180137	E.....T.....	150
UFV180251	E.....T.....	150
UFV180284	E.....T.....	150
	T136N и H138T*	
	G153T*	

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KIGTSGSCPNIITNGNGFFATMAWAVPKNDK NKTATNPLTI EVPYICTEGE	200
Линия Yamagata	RL.....A.SKS.....N.....N.....V.....	199
Консенсусная пос-ть	RL.....A.SK.....N.....N.....V.....	199
UFV170088		200
UFV180131	N.T.....	200
UFV180137	N.T.....	200
UFV180251	N.T.....	200
UFV180284	N.T.....	200
	K151N и G153T*	

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	DQITVWGFHS	DNETQMAKLY	GDSKPQKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGFNPQT	250
Линия Yamagata		DK...KN..	...N.....		...S..D..	249
Консенсусная пос-ть		..K...K..	...N.....		...D..	249
UFV170088						250
UFV180131						250
UFV180137						250
UFV180251						250
UFV180284						250

K227Q

H238I

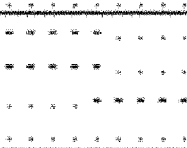
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	EDGGLPQSGR	IVVDYMQVQS	GKTGTITYQR	GILLPQKVWC	ASGRSKVIGK	300
Линия Yamagata		...M..P	...V...V			299
Консенсусная пос-ть		...P	...V...V			299
UFV170088						300
UFV180131						300
UFV180137						300
UFV180251						300
UFV180284						300

Q257E

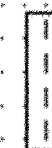
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	SLPLIGEADC LHEKYGGLNK SKPYTTGEHA KAIGNCP WV KTPLKLANGT	350
Линия Yamagata		349
Консенсусная пос-ть		349
UFV170088		350
UFV180131		350
UFV180137		350
UFV180251		350
UFV180284		350

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KYRPPAKLLK ERGFFGAIAG F EGGWEGMT AGWHGYTSHG AHGVAVAADL	400
Линия Yamagata		399
Консенсусная пос-ть		399
UFV170088		400
UFV180131		395
UFV180137		395
UFV180251		395
UFV180284		400

Дел. в виде FPPR^{Y380}



Дел. в виде FPPR^Y



H384I

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KSTQEAINKI	TKNLNSLSEL	EVKNLQRLSG	AMDELHNEIL	ELDEKVDDL	450
Линия Yamagata	.	.	.	.	.	449
Консенсусная пос-ть	.	.	.	.	.	449
UFV170088	.	.	.	.	.	450
UFV180131	.	.	.	.	.	445
UFV180137	.	.	.	.	.	445
UFV180251	.	.	.	.	.	445
UFV180284	.	.	.	.	.	450

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	ADTISSQIEL	AVLLSNEGII	NSEDEHLLAL	ERKLKKMLGP	SAVEIGNGCF	500
Линия Yamagata	.	.	.	.	.	499
Консенсусная пос-ть	.	.	.	.	D.	499
UFV170088	.	.	.	.	.	500
UFV180131	R	.	.	.	.	495
UFV180137	R	.	.	.	.	495
UFV180251	R	.	.	.	.	495
UFV180284	R	.	.	.	.	500

A461R

H476I

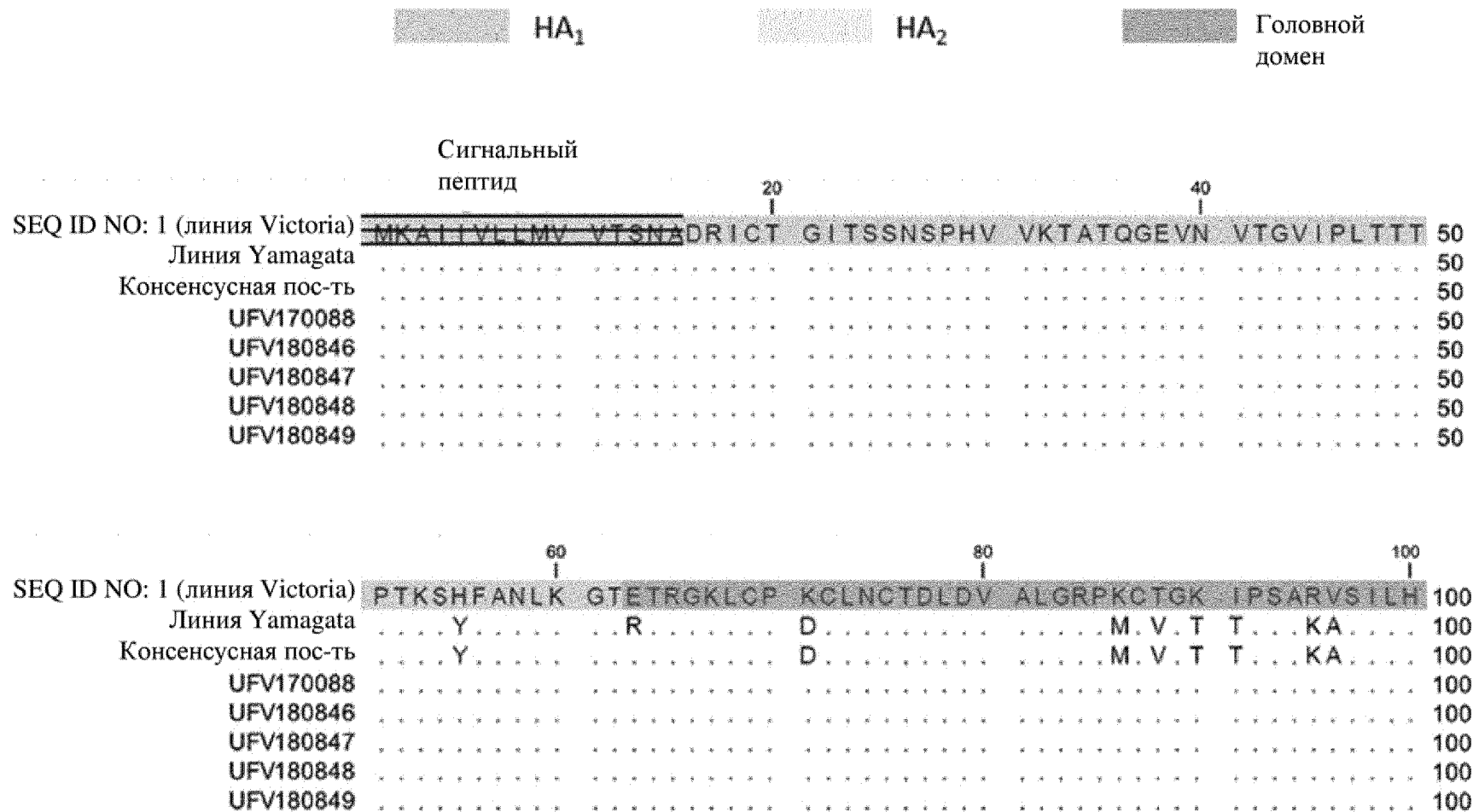
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	ETKHKCNQTC	LDRIAAGTFD	AGEFSLPTFD	SLNITAA-SL	NDDGLDNHTI	549
Линия Yamagata		N		-		548
Консенсусная пос-ть		N		-		548
UFV170088				SG	VPR.SGSGY	550
UFV180131				-		544
UFV180137				-		544
UFV180251				-		544
UFV180284				-		549

Трансмембранный и цитозольный домены

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	LLYYSTAASS	LAVTLMIAIF	VVYMVSRDNV	SCSICL	585
Линия Yamagata		L	I		584
Консенсусная пос-ть					548
UFV170088	PEAPRDGQAY	VRKDGEWVLL	STFLGGS	EPE A	581
UFV180131				EPE A	548
UFV180137				EPE A	548
UFV180251				EPE A	548
UFV180284				EPE A	553

C-метка

ФИГ. 7Е



SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	EVRPVTSGCF	PIMHDRTKIR	QLPNLLRGYE	HIRLSTHNV	NAENAPGGPY	150
Линия Yamagata	. . K			N Q	D . . K	150
Консенсусная пос-ть				 Q	D . . K	150
UFV170088						150
UFV180846						150
UFV180847						150
UFV180848						150
UFV180849						150

T136N и
H138T*

G153T*

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KIGTSGSCP	NTNGNGFFAT	MAWAVPKNDK	NKTATNPLTI	EVPICTEGE	200
Линия Yamagata	RL	A . SKS		- . N . . N	V	199
Консенсусная пос-ть	RL	A . SK		- . N . . N	V	199
UFV170088						200
UFV180846	N . T					200
UFV180847	N . T					200
UFV180848	N . T					200
UFV180849	N . T					200

K151N и
G153T*

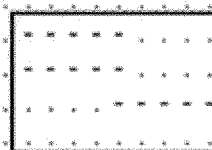
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	DQITVWGFHS	DNETQMAKLY	GDSKPQKFTS	SANGVTTHYV	SQIGGFNPQT	250	
Линия Yamagata	.	DK	KN	N	S	D	249
Консенсусная пос-ть	.	K	K	N	.	D	249
UFV170088	.	.	.	.	.	.	250
UFV180846	.	.	.	Q	.	.	250
UFV180847	.	.	.	Q	.	.	250
UFV180848	.	.	.	Q	.	.	250
UFV180849	.	.	.	Q	.	.	250
			K227Q		H238I		

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	EDGGLPQSGR	IVVDYMOVKS	GKTGTITYQR	GILLPQKVWC	ASGRSKVIGK	300
Линия Yamagata	.	M	P	V	V	299
Консенсусная пос-ть	.	P	V	V	.	299
UFV170088	.	.	.	.	.	300
UFV180846	E	.	.	.	.	300
UFV180847	E	.	.	.	.	300
UFV180848	E	.	.	.	.	300
UFV180849	E	.	.	.	.	300
	Q257E					

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	SLPLIGEADC LHEKYGGLNK SKPYYTGEHA KAIGNCPIWV KTPLKLANGT	350
Линия Yamagata		349
Консенсусная пос-ть		349
UFV170088		350
UFV180846		350
UFV180847		350
UFV180848		350
UFV180849		350

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KYRPPAKLLK ERGFFGAIAG FLEGGWEOMH AGWHGYTSHG AHGVAVAADL	400
Линия Yamagata		399
Консенсусная пос-ть		399
UFV170088		400
UFV180846	 Q	395
UFV180847	 Q	395
UFV180848	 Q	395
UFV180849	 Q	400

Дел. в виде
FPPR^Y380



Дел. в виде
FPPR^Y



H384I

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	KSTQEAINKI	TKNLNSLSEL	EVKNLQRLSG	AMDELHNEIL	ELDEKVDDL	450
Линия Yamagata	.	.	.	.	.	449
Консенсусная пос-ть	.	.	.	.	.	449
UFV170088	.	.	.	.	.	450
UFV180846	.	.	.	.	.	445
UFV180847	.	.	.	.	.	445
UFV180848	.	.	.	.	.	445
UFV180849	.	.	.	.	.	450

SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	ADT	ISSQIEL	AVLLSNEGII	NSEDEHLLAL	ERKLKKMLGP	SAVEIGNGCF	500
Линия Yamagata	.	.	.	.	.	.	499
Консенсусная пос-ть	.	.	.	.	.	D	499
UFV170088	.	.	.	.	.	.	500
UFV180846	.	.	R	.	.	.	495
UFV180847	.	.	R	.	.	.	495
UFV180848	.	.	R	.	.	.	495
UFV180849	.	.	R	.	.	.	500

A461R

H476I

			520		540	С-конц. усечение	
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	ETKHKCNQTC	LDRIAAGTFD	AGEFSLPTFD	SLNITAA	SG	NDDGLDNHTI	549
Линия Yamagata			N				548
Консенсусная пос-ть			N				548
UFV170088					SG	VPR	550
UFV180846						SGSGY	535
UFV180847							535
UFV180848							535
UFV180849							540

			560		580	
SEQ ID NO: 1 (линия Victoria)	LLYYSTAASS	LAVTLMIAIF	VVYMVSRDNV	SCSICL		585
Линия Yamagata		L	I			584
Консенсусная пос-ть						548
UFV170088	PEAPRDGQAY	VRKDGWVLL	STFLGGS	EPE A		581
UFV180846				EPE A		535
UFV180847				EPE A		535
UFV180848				EPE A		535
UFV180849				EPE A		540

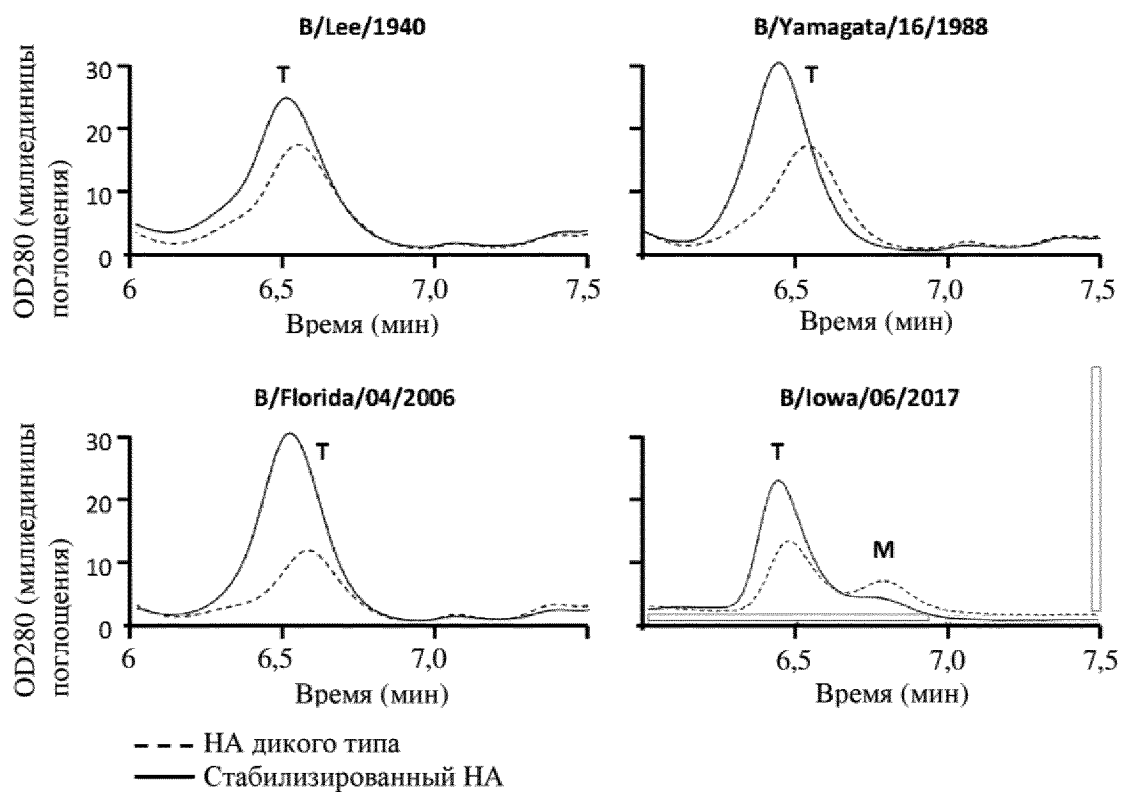
С-метка

Штамм	ID молекулы дикого типа	Экспрессия (мг/мл)	ID стабилизирован- ной ¹ молекулы	Экспрессия (мг/мл)	Кратность повышения
B/Lee/1940	UFV180567	100	UFV180566 ²	185	1,9
B/Yamagata/16/1988	UFV180565	62	UFV180400 ²	170	2,7
B/Florida/04/2006	UFV180571	42	UFV180570 ²	158	3,8
B/Iowa/06/2017	UFV190909	66	UFV190521	106	1,6

¹ "1" означает присутствие стабилизирующих мутаций (K227Q, H238I, H384I, A461R и H476I)

² "2" означает присутствие делеции в виде FPPR по 372-376.

ФИГ. 8А



ФИГ. 8В