

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012105308/10, 15.07.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.07.2009 US 61/225,805;
12.01.2010 US 61/294,426

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2013 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 27.05.2016 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 2008154456 A2, 18.12.2008. WO
2008061243 A2, 22.05.2008. (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.02.2012(86) Заявка РСТ:
US 2010/042161 (15.07.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/008974 (20.01.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

СВЕНСОН Курт (US),
ДОРМИТЦЕР Филип Р. (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС АГ (CH)

(54) КОМПОЗИЦИИ БЕЛКА F RSV И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, вирусологии и иммунологии.
Описаны иммуногенные композиции, содержащие
белок F RSV. Композиции содержат полипептиды
эктодомена белка F RSV в преобладающей илиодной желаемой форме и конформации.
Предложенные изобретения могут быть
использованы в медицине. 2 н. и 14 з.п. ф-лы, 13
ил., 22 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

RU 2243234 C2, 27.12.2004.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 585 227**⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.
A61K 39/155 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012105308/10, 15.07.2010**

(24) Effective date for property rights:
15.07.2010

Priority:

(30) Convention priority:
15.07.2009 US 61/225,805;
12.01.2010 US 61/294,426

(43) Application published: **20.08.2013 Bull. № 23**

(45) Date of publication: **27.05.2016 Bull. № 15**

(85) Commencement of national phase: **15.02.2012**

(86) PCT application:
US 2010/042161 (15.07.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/008974 (20.01.2011)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "JUrIdicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

SVENSON Kurt (US),
DORMITTSEr Filip R. (US)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)

(54) **RSV F PROTEIN COMPOSITION AND METHODS FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, virology and immunology. Disclosed are immunogenic compositions containing protein F RSV. Compositions contain polypeptides protein ecto domains F RSV in

predominant or one desired shape and conformation.

EFFECT: proposed inventions can be used in medicine.

16 cl, 13 dwg, 22 tbl, 10 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По данной заявке испрашивается приоритет по патентной заявке США № 61/225805, поданной 15 июля 2009 года, и патентной заявке США № 61/294426, поданной 12 января 2010 года. Все идеи указанных выше заявок включены в настоящий документ в качестве

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) представляет собой оболочечный несегментированный вирус с отрицательной РНК-цепью семейства *Paramyxoviridae*, род *Pneumovirus*. Он является наиболее частой причиной бронхолита и пневмонии среди 10 детей на первом году жизни. RSV также вызывает повторяющиеся инфекции, включающие тяжелое заболевание нижних дыхательных путей, которое может возникать в любом возрасте, особенно среди пожилых людей или людей с нарушениями сердечной, легочной или иммунной систем.

Для инфицирования клетки-хозяина парамиксовирусам, таким как RSV, подобно 15 другим оболочечным вирусам, таким как вирус гриппа и ВИЧ, требуется слияние мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина. В случае RSV консервативный белок слияния (F RSV) осуществляет слияние вирусной и клеточной мембраны путем сопряжения необратимого сворачивания белка и соседнего положения мембран. В современных моделях, основанных на исследованиях парамиксовирусов, белок F RSV 20 первоначально сворачивается в метастабильную конформацию "до слияния". В процессе вхождения в клетку конформация "до слияния" претерпевает повторное сворачивание и конформационные изменения в его стабильную конформацию "после слияния".

Белок F RSV транслируется с мРНК в белок из приблизительно 574 аминокислот, обозначаемый как F₀. Посттрансляционный процессинг F₀ включает удаление N- 25 концевой сигнальной пептида с помощью сигнальной пептидазы в эндоплазматической сети. F₀ также расщепляется в двух участках (приблизительно 109/110 и приблизительно 136/137) клеточными протеазами (в частности, фурином) в транс-аппарате Гольджи. Это расщепление обеспечивает удаление короткой встроенной последовательности и приводит к образованию двух субъединиц, обозначаемых как F₁ (~50 кДа; C-концевая; 30 приблизительно остатки 137-574) и F₂ (~20 кДа; N-концевая; приблизительно остатки 1-109), которые остаются связанными друг с другом. F₁ содержит гидрофобный пептид слияния на его N-конце, а также две амфипатические области с семичленными повторами (HRA и HRB). HRA находится вблизи пептида слияния, а HRB расположен вблизи 35 трансмембранного домена. Три гетеродимера F₁-F₂ собираются в вирионе в качестве гомотримеров F₁-F₂.

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время не доступна, но является желательной. Одним возможным подходом для получения вакцины является 40 субъединичная вакцина на основе очищенного белка F RSV. Однако для этого подхода желательно, чтобы очищенный белок F RSV находился в единой форме и конформации, которая стабильна с течением времени, является постоянной между партиями вакцин и которую удобно очищать.

Белок F RSV можно укорачивать, например, путем делеции трансмембранного домена и цитоплазматического конца, для обеспечения его экспрессии в качестве эктодомена, 45 который может быть растворимым. Дополнительно, хотя белок F RSV первоначально транслируется в качестве мономера, мономеры расщепляются и собираются в тримеры. Когда белок F RSV находится в форме расщепленных тримеров, экспонируется гидрофобный пептид слияния. Экспонированные гидрофобные пептиды слияния на

различных тримерах, например, растворимых тримерах эктодомена, могут связываться друг с другом с образованием розеткообразных структур. Гидрофобные пептиды слияния также могут связываться с липидами и липопротеинами, например из клеток, которые используют для экспрессии рекомбинантного растворимого белка F RSV.

5 Вследствие комплексности процессинга, структуры и сворачивания белка F RSV, очищенные гомогенные иммуногенные препараты трудно получить.

Таким образом, существует потребность в усовершенствованных композициях белка F RSV и в способах получения композиций белка F RSV.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Изобретение относится к иммуногенным композициям, которые содержат один или более полипептидов F RSV и к определенным сконструированным белкам F RSV и нуклеиновым кислотам, которые кодируют сконструированные белки F RSV.

В одном аспекте белок F RSV является растворимым. Например, в белке F RSV могут быть удалены трансмембранная область и цитоплазматический конец. В некоторых
15 аспектах растворимый F RSV содержит одно или более из: 1) одна или более мутаций в одном или обоих участках расщепления фурином, 2) одна или более мутаций в пептиде слияния, 3) одна или более мутаций в линкере p27, 4) добавленную последовательность олигомеризации, и 5) добавленную аминокислотную последовательность, которая обеспечивает участок расщепления протеазой. В дополнительных или альтернативных
20 аспектах, белок F RSV представляет собой мономер, тример или комбинацию мономеров и тримеров. Тример может быть монодисперсным или в форме розеткообразных структур. В следующих дополнительных или альтернативных аспектах белок F RSV может быть в конформации "до слияния", промежуточной конформации или конформации "после слияния".

25 В одном аспекте иммуногенная композиция содержит один или более полипептидов F респираторно-синцитиального вируса (F RSV), в которых аминокислоты 100-150 заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92. В некоторых
30 вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В другом аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид F RSV, в котором аминокислоты 100-150 в F RSV заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является
35 растворимым (например, эктодомен).

В другом аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид F RSV, в котором аминокислоты 100-150 F RSV заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 92. В некоторых
40 вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В другом аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид F RSV, в котором аминокислоты 100-150 заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым
45 (например эктодомен).

В другом аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид F RSV, где F RSV содержит аминокислоты 23-99 и 151-524 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например

эктодомен).

В одном аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид и/или HIS-метка отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В одном аспекте иммуногенная композиция содержит SEQ ID NO: 68 или альтернативно SEQ ID NO: 68, в которой сигнальный пептид и, необязательно, HIS-метка отсутствуют.

В другом аспекте иммуногенная композиция содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 71 и любой из указанных выше последовательностей, в которых сигнальный пептид, и, необязательно, HIS-метка отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В предпочтительных вариантах осуществления иммуногенная композиция включает адъювант. Адъювант предпочтительно представляет собой соль алюминия, эмульсию типа "сквален-в-воде" (такую как MF59), соединение бензонафтиридина, фосфолипидное соединение (такое как E6020), низкомолекулярный иммуностимулятор или комбинацию двух или нескольких из указанных выше.

Другой аспект изобретения относится к рекомбинантным полипептидам F RSV. F RSV может быть в форме мономера, тримера, розеткообразных структур из тримеров или комбинации мономеров и тримеров. Рекомбинантный полипептид может включать гетерологичный домен олигомеризации, эпитоп или сигнальный пептид. Гетерологичный домен олигомеризации предпочтительно представляет собой домен тримеризации из гемагглютинирина вируса гриппа, из spike вируса SARS, или из gp41 ВИЧ, NadA, модифицированного GCN4 или ATCase.

В одном аспекте в рекомбинантном полипептиде F RSV аминокислоты 100-150 заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В другом аспекте в рекомбинантном полипептиде F RSV аминокислоты 100-150 F RSV заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В другом аспекте в рекомбинантном полипептиде F RSV аминокислоты 100-150 F RSV заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

В другом аспекте в рекомбинантном полипептиде F RSV аминокислоты 100-150 F RSV заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

5 В одном аспекте рекомбинантный полипептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID
10 NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, и любой их комбинации. Необязательно, сигнальный пептид и/или HIS-метка отсутствуют. В
15 некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV является растворимым (например эктодомен).

Другой аспект относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из указанных выше полипептидов. Нуклеиновая кислота может представлять собой самореплицирующуюся молекулу РНК.

20 Другой аспект изобретения относится к иммуногенной композиции, содержащей самореплицирующуюся РНК, которая кодирует полипептид F RSV. Иммуногенная композиция может включать систему для доставки.

Другой аспект изобретения относится к способам индукции иммунного ответа на F RSV путем введения любой из иммуногенных композиций.

25 Изобретение относится к способам получения композиций и к композициям, которые содержат белок F RSV, такой как растворимые полипептиды эктодомена F RSV, в том числе к иммуногенным композициям. Полипептиды эктодомена F RSV могут быть в единой форме, такой как нерасщепленные мономеры, нерасщепленные тримеры, расщепленные тримеры, или розеткообразные структуры расщепленных тримеров.
30 Полипептиды эктодомена F RSV также могут быть в двух или более формах, например двух или более формах, которые существуют в равновесном состоянии, таком как равновесное состояние между нерасщепленными мономерами и нерасщепленными тримерами. Изобретение имеет несколько преимуществ. Например, присутствие единой желаемой формы F RSV в иммуногенной композиции обеспечивает более предсказуемый
35 иммунный ответ, когда композицию вводят индивидууму, и более постоянную стабильность и другие физические и химические характеристики при включении в состав вакцины.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения композиции, содержащей расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV. Способ включает а)
40 предоставление нерасщепленных полипептидов эктодоменов белка F RSV, содержащих один или более участков расщепления протеазой, которые при расщеплении образуют фрагменты F₁ и F₂, и b) расщепление нерасщепленных полипептидов эктодоменов белка F RSV протеазой или протеазами, которые распознают участок или участки расщепления протеазой. Как правило, аминокислотная последовательность нерасщепленных
45 полипептидов эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, и полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их нерасщепленными в положении от аминокислоты 101 до аминокислоты 161, (например не расщеплены в участках расщепления фурином в

положениях 106-109 и 131-136). В некоторых вариантах осуществления нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, предоставленные в а), являются очищенными.

Нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, предоставленные в а), могут содержать неизмененный пептид слияния или измененный пептид слияния (например, делеция пептида слияния или мутация пептида слияния). Когда нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, предоставленные в а), содержат неизмененный пептид слияния, расщепление на стадии б) приводит к образованию розеткообразных структур тримеров. Когда нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, предоставленные в а), содержат измененный пептид слияния, расщепление на стадии б) приводит к образованию тримеров.

Дополнительно способ может включать необязательную стадию очистки розеткообразных структур или тримеров, образующихся при расщеплении нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. В предпочтительных вариантах осуществления расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, продуцируемые этим способом, по существу не содержат липидов и липопротеинов.

В другом аспекте изобретение представляет собой способ получения композиции, содержащей нерасщепленные мономеры, тримеры или комбинацию мономеров и тримеров полипептида эктодомена белка F RSV. Способ включает а) предоставление биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV; и б) очистку нерасщепленных мономеров или тримеров полипептида эктодомена белка F RSV из биологического материала. Как правило, аминокислотная последовательность нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, и полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются клеткой-хозяином, которая продуцирует их нерасщепленными в положении от аминокислоты 101 до аминокислоты 161, (например, не расщеплены в участках расщепления фурином в положениях 106-109 и 131-136). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV дополнительно содержит измененные участки расщепления трипсином, и полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином в участке между аминокислотой 101 и аминокислотой 161. В других вариантах осуществления аминокислотная последовательность нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV дополнительно содержит измененный пептид слияния.

В некоторых вариантах осуществления нерасщепленные тримеры полипептида эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления нерасщепленные мономеры полипептида эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления смесь нерасщепленных мономеров и тримеров эктодомена белка F RSV, которые могут быть в состоянии динамического равновесия, очищают. В предпочтительных вариантах осуществления расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, получаемые способом, по существу не содержат липидов и липопротеинов.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ получения композиции, содержащей расщепленные мономеры, тримеры или комбинацию мономеров и тримеров полипептида эктодомена белка F RSV. Способ включает а) предоставление биологического материала, который содержит расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния; и б) очистку расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала.

В некоторых вариантах осуществления расщепленные тримеры полипептида эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления расщепленные

мономеров полипептида эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления смесь расщепленных мономеров и тримеров эктодомена белка F RSV, которые могут находиться в состоянии динамического равновесия, очищают. В предпочтительных вариантах осуществления расщепленные полипептиды эктодомена

5 белка F RSV, получаемые согласно способу, предпочтительно по существу не содержат липидов и липопротеинов. В другом варианте осуществления расщепленный тример эктодомена белка F RSV, содержащий измененный пептид слияния, очищают.

В других аспектах изобретение относится к композициям, включающим иммуногенные композиции, продуцируемые с использованием способов по изобретению.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На ФИГ. 1 представлена схема F RSV дикого типа (ФИГ. 1A) и конструкции эктодомена, в которой трансмембранный домен и цитоплазматический конец удалены и на С-конец добавлена необязательная HIS6-метка (ФИГ. 1B). Для ясности, нумерация остатков относится к штамму A2 F RSV дикого типа, начиная с N-концевого сигнального

15 пептида, и не изменена в конструкциях, содержащих делеции аминокислот. На схеме обозначена сигнальная последовательность или сигнальный пептид (sp). На ФИГ. 1A представлена схема белка F RSV, демонстрирующая сигнальную последовательность или сигнальный пептид (SP), линкерную область p27, пептид слияния (FP), домен HRA (HRA), домен HRB (HRB), трансмембранную область (TM) и цитоплазматический конец

20 (CT). Границы С-конца в эктодоме могут варьировать. На ФИГ. 1B представлена общая схема конструкции эктодомена F RSV, на которой изображены общие признаки со схемой на ФИГ. 1A и включая необязательную HIS₆-метку (HIS-MЕТКА). Участки расщепления фурином присутствуют в положениях аминокислот 109/110 и 136/137.

Также на ФИГ. 1C представлена аминокислотная последовательность аминокислот

25 100-150 F RSV (дикий тип) (SEQ ID NO: 108) и нескольких белков (Furmt-SEQ ID NO: 3; Furdel-SEQ ID NO: 4; Furx-SEQ ID NO: 6; Furx R113Q, K123N, K124N-SEQ ID NO: 5; Furx R113Q, K123Q, K124Q-SEQ ID NO: 92; Delp21 furx-SEQ ID NO: 7; Delp23 furx-SEQ ID NO: 8; Delp23 furdel-SEQ ID NO: 9; N-term Furin-SEQ ID NO: 10; C-term Furin-SEQ ID NO: 11; Fusion Peptide Deletion1-SEQ ID NO: 12; и Factor Xa-SEQ ID NO: 13), в которых один или

30 оба участка расщепления фурином и/или область пептида слияния подвергнуты мутации или удалены. На ФИГ. 1C, символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении удалена.

На ФИГ. 2 представлена аминокислотная последовательность С-конца от положения аминокислоты 488 до начала TM-области в F RSV (дикий тип) (SEQ ID NO: 94) и

35 нескольких белках (SEQ ID NO: 95-100), которые содержат добавленные к ним участки расщепления протеазой. На ФИГ. 2, символ "-" указывает на отсутствие аминокислоты в этом положении.

На ФИГ. 3 представлена хроматограмма и изображение электрофоретического геля, демонстрирующее очистку мономеров (3) F RSV с использованием эксклюзионной

40 хроматографии.

На ФИГ. 4A-4F представлена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 101) плазмиды, кодирующей самореплицирующуюся молекулу РНК рТ7-TC83R-FL.RSVF (A317), которая кодирует гликопротеин F респираторно-синцитиального вируса (RSV-F). Нуклеотидная последовательность, кодирующая RSV-F, подчеркнута.

45 На ФИГ. 5 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей белков F из нескольких штаммов RSV. Выравнивание проводили с использованием алгоритма, описанного Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22):10881-10890, с использованием параметров по умолчанию (таблица сравнения символов Blossum 62,

штраф за внесение пропуска: 12, штраф за продолжение пропуска: A2, белок F штамма A2 (регистрационный номер AF035006) (SEQ ID NO: 102); CP52, белок F штамма CP52 (регистрационный номер AF013255) (SEQ ID NO: 103); B, белок F штамма B (регистрационный номер AF013254) (SEQ ID NO: 104); long, белок F штамма long (регистрационный номер AY911262) (SEQ ID NO: 105), и штамм 18537, белок F штамма 18537 (регистрационный номер Swiss Prot P13843) (SEQ ID NO: 106). Также представлена консенсусная последовательность белка F (SEQ ID NO: 107).

На ФИГ. 6 представлены значимые области эксклюзионных (SEC) хроматограмм для очистки выбранных антигенов F RSV. Основной пик, содержащий указанный антиген, показан звездочкой, а время удержания на колонке Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) представлено в миллилитрах. На калиброванной колонке приблизительно время удержания 47 млс, 65 млс и 77 млс соответствует свободному объему колонки, удержанию тримера F RSV и удержанию мономера F RSV, соответственно. На ФИГ. 6А нерасщепленная конструкция Delp23 Furdel ($\Delta p23$ Furdel) очищена из пика мономера на уровне приблизительно 77 млс. Когда нерасщепленный антиген Delp23 Furdel F RSV обрабатывают трипсином, белок может образовывать розеткообразные структуры, которые после этого мигрируют на SEC в свободном объеме при приблизительно 47 млс (ФИГ. 6В). Расщепленные молекулы тримера F RSV с делецией пептида слияния очищены из пика тримера при времени удержания приблизительно 65 млс (ФИГ. 6С), хотя нерасщепленная конструкция Delp21 Furx ($\Delta p21$ Furx) очищена из пика мономера при приблизительно 77 млс (ФИГ. 6D).

На ФИГ. 7 представлены типичные ЕМ-изображения для выбранных антигенов F RSV. На ФИГ. 7А представлено ЕМ-изображение для F RSV $\Delta p23$ (Delp23) перед обработкой трипсином. Форма вилки на ФИГ. 7А, согласующаяся с конформацией тримера "после слияния", не всегда наблюдается в нерасщепленной конструкции $\Delta p23$ (Delp23) Furdel. Когда конструкцию $\Delta p23$ (Delp23) Furdel обрабатывали трипсином и очищали из свободного объема колонки SEC и наблюдали с помощью ЕМ, было выявлено, что белки имеют принятые ими конформации розеткообразных структур (ФИГ. 7В). Когда конструкцию F RSV с делецией пептида слияния очищали из пика тримера на колонке SEC, наблюдали монодисперсную форму вилки, согласующуюся с тримером "после слияния" (ФИГ. 7С). На ФИГ. 7D представлены три препарата: $\Delta p21$ (Delp21) furx F RSV (обозначен как мономер), F RSV с делецией пептида слияния (дорожки, обозначенные как тример) и очищенные розеткообразные структуры F RSV (обозначенные как розеткообразные структуры). Гель содержит несколько дорожек GE Full Range Standard (стандарты молекулярной массы обозначены слева на геле), в то время как справа на геле указано приблизительное время удержания фрагментов F RSV.

На ФИГ. 8А-8С представлены графики, демонстрирующие, что мономеры (нерасщепленный $\Delta p21$ (Delp21) furx), розеткообразные структуры тримеров (расщепленный $\Delta p23$ (Delp23) Furdel) и тримеры (делеция пептида слияния) полипептидов эктодомена F RSV являются иммуногенными у хлопковых хомячков. Титры IgG против F RSV и нейтрализующих антител против RSV в сыворотке измеряли через 2 недели после 1 вакцинации (2wp1), 3 недели после 1 вакцинации (3wp1) и/или 2 недели после 2 вакцинации (2wp2).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к полипептидам и/или белкам F респираторно-синцитиального вируса (F RSV), иммуногенным композициям, содержащим полипептиды и/или белки F RSV, способам получения полипептидов и/или белков F RSV и композиций,

содержащих полипептиды и/или белки F RSV, и к нуклеиновым кислотам, которые кодируют полипептиды и/или белки F RSV.

Как правило, иммуногенные композиции содержат полипептиды и/или белки F RSV, которые содержат мутации (например, замены, делеции или вставки), которые обеспечивают благоприятные характеристики, такие как одно или более из: 1) стабилизированная конформация "до слияния" или промежуточная (не "после слияния") конформация, 2) сниженное или устраненное экспонирование пептида слияния, 3) увеличенная стабильность (например, сниженная агрегация и/или деградация), и 4) более тесное сходство с активным вирусным белком F1/F2. Эти характеристики обеспечивают преимущества для иммуногенных композиций и для изготовления иммуногенных композиций. Например, как описано в настоящем документе, конформации белка F RSV не "после слияния" (т.е. конформация "до слияния", промежуточная конформация) могут быть лучшими иммуногенами и вызывать лучший ответ нейтрализующих антител. Снижение или устранение экспозиции пептида слияния, например, путем внесения мутаций или делеций в участки расщепления фурином, может снизить гидрофобность полипептида и упростить очистку, а также снизить или устранить связывание белка F RSV с клеточными мембранами у индивидуума, которому вводят этот белок. Увеличенная стабильность белка способствует получению иммуногенных композиций, в которых белок обладает сниженной тенденцией к агрегации или деградации, что обеспечивает более предсказуемый иммунный ответ, когда композицию вводят индивидууму. Наконец, мутантные полипептиды или белки F RSV, которые напоминают вирусный белок F1/F2, например, с делецией всей или части линкерной области p27, могут вызвать лучший ответ нейтрализующих антител. Другие преимущества изобретения описаны в настоящем документе.

Также изобретение относится к способам получения композиций, которые содержат белок F RSV, в частности, полипептиды эктодомена F RSV, и к композициям, включающим иммуногенные композиции, содержащие белок F RSV. Предпочтительно, полипептиды эктодомена F RSV находятся в единой форме или в динамическом равновесии между известными формами.

Определения

Как используют в настоящем документе "совокупность" относится более чем к одному полипептиду или белку F RSV, присутствующим в композиции. Совокупность может быть по существу гомогенной, в которой по существу все полипептиды или белки F RSV являются по существу одинаковыми (например, одинаковая аминокислотная последовательность, одинаковая конформация), гетерогенной, или она может иметь желаемую степень гомогенности (например, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 55%, по меньшей мере, приблизительно 60%, по меньшей мере, приблизительно 65%, по меньшей мере, приблизительно 70%, по меньшей мере, приблизительно 75%, по меньшей мере, приблизительно 80%, по меньшей мере, приблизительно 85%, по меньшей мере, приблизительно 90%, по меньшей мере, приблизительно 95%, по меньшей мере, приблизительно 99% полипептидов или белков F RSV представляют собой конформацию "до слияния", представляют собой конформацию "после слияния", представляют собой мономеры или представляют собой тримеры).

"Конформация "после слияния"" белка F RSV представляет собой тример, характеризующийся присутствием пучка из шести спиралей, содержащего 3 области HRB и 3 области HRA.

"Конформация "до слияния" белка F RSV представляет собой конформацию,

характеризующуюся тримером, который содержит тройную спираль, содержащую 3 области HRB.

Как используют в настоящем документе, "полипептид эктодомена F RSV" относится к полипептиду белка F RSV, который содержит по существу внеклеточную часть зрелого белка F RSV, с сигнальным пептидом (например, от приблизительно аминокислоты 1 до приблизительно аминокислоты 524, или от приблизительно аминокислоты 22 до приблизительно аминокислоты 524) или без него, но лишен трансмембранного домена и цитоплазматического конца встречающегося в природе белка F RSV.

Как используют в настоящем документе, "расщепленный полипептид эктодомена F RSV" относится к полипептиду эктодомена F RSV, который был расщеплен по одному или более положениям от приблизительно 101/102 до приблизительно 160/161 с образованием двух субъединиц, в которых одна из субъединиц содержит F₁, а другая субъединица содержит F₂.

Как используют в настоящем документе, "нерасщепленный на С-конце полипептид эктодомена F RSV" относится к полипептиду эктодомена F RSV, который был расщеплен по одному или более положениям от приблизительно 101/102 до приблизительно 131/132, и не был расщеплен по одному или более положениям от приблизительно 132/133 до приблизительно 160/161, с образованием двух субъединиц, в которых одна из субъединиц содержит F₁, а другая субъединица содержит F₂.

Как используют в настоящем документе, "нерасщепленный полипептид эктодомена F RSV" относится к полипептиду эктодомена F RSV, который не расщеплен в одном или более положениях от приблизительно 101/102 до приблизительно 160/161. Нерасщепленный полипептид эктодомена F RSV может представлять собой, например, мономер или тример.

Как используют в настоящем документе, "пептид слияния" относится к аминокислотам 137-154 белка F RSV.

Как используют в настоящем документе, "измененный пептид слияния" относится к пептиду слияния, в котором одна или более аминокислот независимо заменены или удалены, включая замену или делецию всех аминокислот из положений 137-154. Предпочтительно, расщепленные полипептиды эктодомена F RSV, которые содержат "измененный пептид слияния", не образуют розеткообразные структуры.

Как используют в настоящем документе, "очищенный" белок или полипептид представляет собой белок или полипептид, который продуцируют рекомбинантными или синтетическими способами, или который продуцируется его естественным хозяином, и который был выделен из других компонентов или из системы для рекомбинантной или синтетической продукции или естественного хозяина, так чтобы количество белка относительно других макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции, было существенно выше, чем в неочищенном препарате. Как правило, очищенный белок является, по меньшей мере, приблизительно на 50% гомогенным и более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 75%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенным.

Как используют в настоящем документе, "по существу не содержит липидов и липопротеинов" относится к композициям, белкам и полипептидам, которые, по меньшей мере, приблизительно на 95% свободны от липидов и липопротеинов в расчете на массу, когда чистоту белка и/или полипептида (например полипептида F RSV) наблюдают на

геле SDS PAGE, и общее содержание белка измеряют с использованием либо поглощения при УФ280, либо анализа BCA, и содержание липида и липопротеина определяют с использованием анализа с фосфолипазой C (Wako, код № 433-36201).

Как используют в настоящем документе, "измененный участок расщепления фурином" относится к аминокислотной последовательности в положениях приблизительно 106-109 и в положениях приблизительно 133-136 во встречающемся в природе белке F RSV, которая распознается и расщепляется фурином или фурин-подобными протеазами, но в нерасщепленном полипептиде эктодомена белка F RSV содержит одну или более аминокислотных замен, одну или более аминокислотных делеций, или комбинацию одной или более аминокислотных замен и одной или более аминокислотных делеций, так чтобы полипептид эктодомена F RSV, который содержит измененный участок расщепления фурином, секретировался из клетки, которая продуцирует его нерасщепленным в измененном участке расщепления фурином.

Признаки эктодоменов белка F RSV, пригодных для применения в этом изобретении, описаны в настоящем документе с указанием конкретных аминокислот, которые идентифицированы по положению аминокислот в последовательности белка F RSV их штамма A2 (SEQ ID NO: 1). Эктодомены белка F RSV могут иметь аминокислотную последовательность белка F из штамма A2 или любого другого желаемого штамма. Когда используют эктодомен белка F из штамма, отличного от штамма A2, аминокислоты белка F нумеруют на основании нумерации белка F из штамма A2, со вставкой пропусков при необходимости. Это можно осуществлять путем выравнивания последовательности любого желаемого белка F RSV с белком F штамма A2, как показано в настоящем документе для белков F из штамма A2, штамма CP52, штамма B, штамма long и штамма 18537. См. ФИГ. 5. Выравнивание последовательностей предпочтительно проводят с использованием алгоритма, описанного Corpet, Nucleic Acid Research, 1998, 16(22):10881-10890, с использованием параметров по умолчанию (таблица сравнения символов Blossum 62, штраф за внесение пропуска: 12, штраф за продолжение пропуска: 2).

Изобретение относится к растворимым полипептидам и белкам F RSV и иммуногенным композициям, содержащим растворимые полипептиды и белки F RSV, а также к композициям, содержащим нуклеиновые кислоты (например самореплицирующиеся молекулы РНК), которые кодируют растворимые полипептиды и белки F RSV.

Полипептиды F RSV (например полипептиды эктодоменов) могут быть в любой желаемой форме, как например, в единой форме, такой как нерасщепленные мономеры, нерасщепленные тримеры, расщепленные тримеры или розеткообразные структуры расщепленных тримеров. Полипептиды эктодомена F RSV также могут быть в двух или более формах, например, двух или более формах, которые существуют в равновесном состоянии, такое как равновесное состояние между нерасщепленными мономерами и нерасщепленными тримерами. Изобретение имеет несколько преимуществ. Например, присутствие единой желаемой формы RSV или динамического равновесия между известными формами в иммуногенной композиции обеспечивает более предсказуемый состав, растворимость и стабильность и более предсказуемый иммунный ответ при введении композиции индивидууму.

Предпочтительно, полипептиды эктодомена F RSV находятся в единой форме, такой как нерасщепленные мономеры, нерасщепленные тримеры, расщепленные тримеры, розеткообразные структуры расщепленных тримеров, или в состоянии динамического равновесия между подгруппой таких форм (например, равновесие между

нерасщепленными мономерами и нерасщепленными тримерами).

В одном аспекте изобретения полипептиды и белки F RSV находятся в конформации "до слияния". Эпитопы конформации "до слияния" могут быть способны лучше индуцировать антитела, которые могут распознавать и нейтрализовать природные

5 вирионы.

В одном варианте осуществления изобретения иммуногенная композиция содержит совокупность гликопротеинов F респираторно-синцитиального вируса в конформации "до слияния". В другом аспекте изобретения иммуногенная композиция содержит совокупность гликопротеинов F респираторно-синцитиального вируса, в которой не

10 является предпочтительной конформация "после слияния" по сравнению с выделенными гликопротеинами F RSV.

Также изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей полипептид, который экспонирует эпитоп, присутствующий в конформации "до слияния" или в промежуточной конформации гликопротеина F респираторно-синцитиального вируса,

15 но который лишен конформации гликопротеина F "после слияния".

Гликопротеин F

Гликопротеин F RSV контролирует проникновение вируса путем слияния между оболочкой вириона и плазматической мембраной клетки-хозяина. Он представляет собой интегральный белок типа I, однократно проходящий через мембрану, имеющий

20 четыре основных домена: N-концевая транслоцирующая в ER сигнальная последовательность (SS), эктодомен (ED), трансмембранный домен (TM) и цитоплазматический конец (CT). CT содержит один пальмитоилированный остаток цистеина. Последовательность белка F является высоко консервативной среди изолятов RSV, но постоянно эволюционирует (7). В отличие от большинства парамиксовирусов,

25 белок F в RSV может опосредовать входение и образование синцития, независимо от других вирусных белков (в других парамиксовирусах в дополнение к F обычно необходим HN).

mPHK F hRSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначаемый как F₀, который содержит последовательность сигнального пептида на

30 N-конце, которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматической сети. F₀ расщепляется клеточными протеазами (в частности фурином) в двух участках (а.к. 109/110 и 136/137) в транс-аппарате Гольджи с удалением короткой гликозилированной встроенной последовательности и с образованием двух субъединиц, обозначенных как F₁ (~50 кДа; C-конец; остатки 137-574) и F₂ (~20 кДа; N-конец; остатки 1-109) (см.,

35 например, ФИГ. 1). F₁ содержит гидрофобный пептид слияния на его N-конце, а также две гидрофобных области с семичленными повторами (HRA и HRB). HRA находится вблизи пептида слияния и HRB находится вблизи трансмембранного домена (см. например, ФИГ. 1). Гетеродимеры F₁-F₂ собираются в вирионе в качестве гомотримеров.

RSV существует в качестве единичного серотипа, но имеет две антигенных подгруппы: А и В. Гликопротеины F этих двух групп идентичны приблизительно на 90%. В изобретении можно использовать подгруппу А, подгруппу В или комбинацию или

40 гибриды обеих из них. Примером последовательности для подгруппы А является SEQ ID NO: 1 (штамм А2; GenBank GI: 138251; Swiss Prot P03420), и для подгруппы В является SEQ ID NO: 2 (штамм 18537; GI: 138250; Swiss Prot P13843). Как SEQ ID NO: 1, так и SEQ ID NO: 2 представляют собой последовательности из 574 аминокислот. Сигнальный пептид в штамме А2 представляет собой а.к. 1-21, но в штамме 18537 он представляет собой 1-22. В обеих последовательностях TM-домен представляет собой приблизительно

а.к. 530-550, но альтернативно он был описан в качестве 525-548.

SEQ ID NO: 1

1 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
IE 60

5 61 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPPTNNRARRELPRFM
NYTLN 120

121 NAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST
NKA VVS 180

10 181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF
SVN 240

241 AGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV
LAYV 300

301 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQ
AETCKV 360

15 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC
YGKT 420

421 KCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPI
INFYDP 480

20 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTHIIVIVILLS
540

541 LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN 574

SEQ ID NO: 2

1 MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVIT
IE 60

25 61 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQY
MNYTIN 120

121 TTKNLNVSISKRRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTN
KAVVS 180

30 181 LSNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLLPVNVQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLLEITREF
SVN 240

241 AGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV
LAYV 300

301 VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQA
DTCKV 360

35 361 QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCY
GKT 420

421 KCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKLEGKNLYVKGEPI
INY YDP 480

40 481 LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTHIIVIVVLLS
540

541 LIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSK 574

В изобретении может быть использована любая желаемая аминокислотная
последовательность F RSV, такая как аминокислотная последовательность SEQ ID NO:
1 или 2, или последовательность, обладающая идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 2.

45 Как правило, она обладает, по меньшей мере, 75% идентичностью с SEQ ID NO: 1 или
2, например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по
меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере,
99% идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 2. Последовательность может быть

встречающейся в природе в RSV.

Когда в изобретении используется эктодомен белка F, целиком или частично, он может содержать:

(i) полипептид, содержащий аминокислоты приблизительно 22-525 SEQ ID NO: 1.
 (ii) полипептид, содержащий аминокислоты приблизительно 23-525 SEQ ID NO: 2.
 (iii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, обладающую, по меньшей мере, 75% идентичностью (например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичностью) с (i) или (ii).

(iv) полипептид, содержащий фрагмент (i), (ii) или (iii), где фрагмент содержит, по меньшей мере, один эпитоп белка F. Фрагмент обычно имеет длину, по меньшей мере, приблизительно 100 аминокислот, например, по меньшей мере, приблизительно 150, по меньшей мере, приблизительно 200, по меньшей мере, приблизительно 250, по меньшей мере, приблизительно 300, по меньшей мере, приблизительно 350, по меньшей мере, приблизительно 400, по меньшей мере, приблизительно 450 аминокислот.

Эктодомен может представлять собой форму F_0 с сигнальным пептидом или без него, или он может содержать две отдельных пептидных цепи (например субъединицу F_1 и субъединицу F_2), которые ассоциированы друг с другом, например, субъединицы могут быть связаны дисульфидной связью. Таким образом, в эктодоме могут отсутствовать все или часть аминокислот от приблизительно 101 до приблизительно 161, такие как аминокислоты 110-136. Таким образом, эктодомен, целиком или частично, может содержать:

(v) первую пептидную цепь и вторую пептидную цепь, которая ассоциирована с первой полипептидной цепью, где первая пептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, обладающую, по меньшей мере, 75% идентичностью (например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или даже 100% идентичностью) с от приблизительно аминокислоты 22 до приблизительно аминокислоты 101 SEQ ID NO: 1 или с от приблизительно аминокислоты 23 до приблизительно аминокислоты 101 SEQ ID NO: 2, и вторая пептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, обладающую, по меньшей мере, 75% идентичностью (например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, или даже 100% идентичностью) с от приблизительно аминокислоты 162 до приблизительно 525 SEQ ID NO: 1 или с аминокислотами приблизительно с 162 по 525 SEQ ID NO: 2.

(vi) первую пептидную цепь и вторую пептидную цепь, которая ассоциирована с первой полипептидной цепью, где первая пептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, содержащую фрагмент от приблизительно аминокислоты 22 до приблизительно аминокислоты 101 SEQ ID NO: 1 или от приблизительно аминокислоты 23 до приблизительно аминокислоты 109 SEQ ID NO: 2, и вторая пептидная цепь содержит фрагмент от приблизительно аминокислоты 162 до приблизительно аминокислоты 525 SEQ ID NO: 1 или от приблизительно аминокислоты 161 до приблизительно аминокислоты 525 SEQ ID NO: 2. Один или оба фрагмента содержат, по меньшей мере, один эпитоп белка F. Фрагмент в первой пептидной цепи обычно имеет длину, по меньшей мере, 20 аминокислот, например, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80 аминокислот. Фрагмент во второй пептидной цепи обычно имеет

длину, по меньшей мере, 100 аминокислот, например, по меньшей мере, 150, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 250, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 350, по меньшей мере, 400, по меньшей мере, 450 аминокислот.

(vii) молекулу, получаемую расщеплением (i), (ii), (iii) или (iv) фурином.

5 Таким образом, аминокислотная последовательность, используемая для изобретения, может встречаться в природе в белке F RSV (например растворимый белок F RSV, лишенный ТМ и СТ, аминокислоты приблизительно 522-574 SEQ ID NO: 1 или 2), и/или он может иметь одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) единичных аминокислотных мутаций (инсерций, делеций или замен) относительно природной последовательности RSV. 10 Например, известна мутация белков F для устранения их последовательностей расщепления фурином, тем самым, для предупреждения внутриклеточного процессинга. В определенных вариантах осуществления, белок F RSV лишен ТМ и СТ (аминокислоты приблизительно 522-574 SEQ ID NO: 1 или 2) и содержит одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) единичных аминокислотных мутаций (инсерций, делеций или замен) относительно природной последовательности RSV. 15

Мутации в участках расщепления фурином, расщепления трипсином и в пептиде слияния

Полипептиды или белки F RSV могут содержать одну или более мутаций, которые 20 препятствуют расщеплению по одному или обоим участкам расщепления фурином (т.е. аминокислоты 109 и 136 SEQ ID NO: 1 и 2). Эти мутации могут предотвращать агрегацию растворимых полипептидов или белков и, тем самым, упрощать очистку; они могут предотвращать слияние клетка-клетка, если белок F RSV экспрессируется на поверхности клетки, например, путем экспрессии из вирусного репликона (например частицы репликона альфавируса), или если белок F RSV является компонентом вирусоподобной частицы. Эти мутации, отдельно или в комбинации с другими мутациями, описанными в настоящем документе, также могут стабилизировать белок в конформации "до слияния". 25

Примеры пригодных мутаций участка расщепления фурином включают замену 30 аминокислотных остатков 106-109 в SEQ ID NO: 1 или 2 на RARK (SEQ ID NO: 77), RARQ (SEQ ID NO: 78), QAQN (SEQ ID NO: 79) или IEGR (SEQ ID NO: 80). Альтернативно или дополнительно аминокислотные остатки 133-136 SEQ ID NO: 1 или 2 можно заменять RKKK (SEQ ID NO: 81), ΔΔΔR, QNQN (SEQ ID NO: 82), QQQR (SEQ ID NO: 83) или IEGR (SEQ ID NO: 80). (Δ указывает на то, что аминокислотный остаток удален). Эти мутации 35 можно комбинировать, если желательно, с другими мутациями, описанными в настоящем документе, такими как мутации в области p27 (аминокислоты 110-136 SEQ ID NO: 1 или 2), включая делецию области p27 целиком или частично.

Эти мутации участка расщепления фурином можно комбинировать, если желательно, с другими мутациями, описанными в настоящем документе, такими как мутации участка 40 расщепления трипсином и мутации пептида слияния. Примеры пригодных мутаций участка расщепления трипсином включают делецию любого остатка лизина или аргинина приблизительно между положением 101 и положением 161 SEQ ID NO: 1 или 2, или замену любого такого остатка лизина или аргинина аминокислотой, отличной от лизина или аргинина. Например, остатки лизина и/или аргинина в области p27 45 (приблизительно аминокислоты 110-136 SEQ ID NO: 1 или 2) можно заменять или удалять, включая делецию области p27 целиком или частично.

В конкретных вариантах осуществления последовательность аминокислотных остатков 100-150 полипептида или белка F RSV, такая как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2

или их растворимые эктодомены, представляет собой

(Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKKKFLGFLLGVGSAIAS
(SEQ ID NO: 3)

(Furdel)TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKK---RFLGFLLGVGSAIAS (SEQ
ID NO: 4)

(Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSQNNQNQNFLGFLLGVGSAIAS
(SEQ ID NO: 6)

(Furx R113Q, K123N, K124N) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAANTNTVLSQNNQN
NFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO: 5)

(Furx R113Q, K123Q, K124Q)) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVLSQNNQN
NFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO: 92)

(Delp21Furx) TPATNNQAQN-----QNNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID
NO: 7)

(Delp23Furx)TPATNNQAQN-----QNNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:
8)

(Delp21 furdel)TPATNNRARQ-----QNQQQRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID
NO: 109)

(Delp23furdel)TPATNNRARQ-----QQQRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:
9)

(Nterm Furin) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAQQTNVLSQNNQNQNFLGFLLGVG
SAIAS (SEQ ID NO: 10)

(Cterm Furin) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVLSKKRKRRLGFLLGVG
SAIAS (SEQ ID NO: 11)

(Fusion peptide deletion 1) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKR---
-----SAIAS (SEQ ID NO: 12),

(Fusion peptide deletion 2) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKR---
--GVGSAIAS (SEQ ID NO: 91), или

(Factor Xa) TPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKIEGRFLGFLLGVGSAIAS
(SEQ ID NO: 13); где символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении
удалена.

В дополнение к мутациям участка расщепления фурином и пептида слияния, или
альтернативно, растворимые полипептиды или белки F RSV, такие как белки, в которых
отсутствует трансмембранная область и цитоплазматический конец, могут содержать
одну или более последовательностей олигомеризации. Когда присутствует

последовательность олигомеризации, она предпочтительно представляет собой
последовательность тримеризации. Пригодные последовательности олигомеризации
хорошо известны в данной области и включают, например, бисперальный белок
лейциновой молнии GCN4 дрожжей, тримеризующую последовательность из фибрина
бактериофага T4 ("foldon"), и тримерный домен HA вируса гриппа. Эти и другие
последовательности олигомеризации описаны в настоящем документе более подробно.

В конкретных вариантах осуществления последовательность С-конца полипептида
или белка F RSV, начиная с положения 480, представляет собой:

(GCN) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIA
RIKKLIGE (SEQ ID NO: 14)

(HA) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQ
DLEK (SEQ ID NO: 15)

(Idealized Helix) PLVFPSEDFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNIN (SEQ ID NO: 16)

(foldon short) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNGSGYIPEAPRDG

QAYVRKDGGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 17); или

(foldon long) PLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNKNDDKSGSYIP
EAPRDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 18)

В дополнение к любой комбинации мутаций участка расщепления фурином, мутаций пептида слияния и добавленных последовательностей олигомеризации, или альтернативно, полипептиды или белки F RSV, которые содержат трансмембранную область, могут содержать добавленную к ним аминокислотную последовательность, которая обеспечивает участок расщепления протеазой. Этот тип полипептида или белка F RSV можно получать путем экспрессии его на поверхности клетки, и выделять в растворимой форме после отщепления с поверхности клетки с использованием соответствующей протеазы. Как правило, аминокислотная последовательность, которая обеспечивает участок расщепления протеазой, располагается в пределах 60 аминокислот, приблизительно 50 аминокислот, приблизительно 40 аминокислот, приблизительно 30 аминокислот, приблизительно 20 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, или по существу рядом с N-концом трансмембранного домена (аминокислота 525 SEQ ID NO: 1 или 2). Многие пригодные аминокислотные последовательности, которые расщепляются коммерчески доступными протеазами, хорошо известны в данной области. Например, тромбин расщепляет последовательность LVPR (SEQ ID NO: 75), фактор Ха расщепляет последовательность IEGR и энтерокиназа расщепляет последовательность DDDDK (SEQ ID NO: 76). Эти аминокислотные последовательности можно встраивать в полипептид F RSV. В конкретных вариантах осуществления последовательность полипептида или белка F RSV, начиная с положения 488 по ТМ-область, представляет собой последовательность, представленную на ФИГ. 2.

Иммуногенные полипептиды, используемые согласно изобретению, обычно являются выделенными или очищенными. Таким образом, они не ассоциированы с молекулами, с которыми они обычно, если это возможно, встречаются в природе. Например, белок F, используемый по изобретению, не будет в форме вириона RSV (хотя он может быть в форме искусственного вириона, такого как вирусосома или VLP).

Полипептиды обычно получают путем экспрессии в рекомбинантной системе-хозяине. Как правило, их (например эктодомены RSV) получают экспрессией рекомбинантных конструкций, которые кодируют эктодомены, в пригодных рекомбинантных клетках-хозяевах, хотя можно использовать любые пригодные способы. Пригодные рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, клетки насекомых (например, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*), клетки млекопитающих (например человека, не являющегося человеком примата, лошади, коровы, овцы, собаки, кошки и грызуна (например хомячка), клетки птиц (например, курицы, утки и гуся), бактерий (например, *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Streptococcus* spp.), клетки дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Yarrowia lipolytica*), клетки *Tetrahymena* (например *Tetrahymena thermophila*) или их комбинации. Многие пригодные клетки насекомых и клетки млекопитающих хорошо известны в данной области. Пригодные клетки насекомых включают, например, клетки Sf9, клетки Sf21, клетки Tn5, клетки Schneider S2 и клетки High Five (клональный изолят из исходной клеточной линии *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen)). Пригодные клетки млекопитающих включают, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки эмбриона человека (клетки HEK293, как правило, трансформированные расщепленной ДНК аденовируса 5 типа), клетки NIH-3T3, клетки

293-T, клетки Vero, клетки HeLa, клетки PERC.6 (номер депонированного образца ECACC 96022940), клетки Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), фетальные клетки легкого макака-резус (ATCC CL-160), клетки почки быка Madin-Darby ("MDBK"), клетки почки собаки Madin-Darby ("MDCK") (например, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; или MDCK 33016, DSM ACC 2219), клетки почки детенышей хомячка (BHK), такие как BHK21-F, HKCC и т.п. Пригодные клетки птиц включают, например, эмбриональные стволовые клетки курицы (например клетки EBx®), эмбриональные фибробласты курицы, эмбриональные половые клетки курицы, клетки утки (например клеточные линии AGE1.CR и AGE1.CR.pIX (ProBioGen), которые описаны, например, в *Vaccine* 27:4975-4982 (2009) и WO2005/042728), клетки EB66 и т.п.

Пригодные экспрессирующие системы в клетках насекомых, такие как бакуловирусные системы, известны специалистам в данной области и описаны, например, в Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* № 1555 (1987). Материалы и способы для системы для экспрессии бакуловирус/насекомое представляют собой коммерчески доступный набор от, среди прочего, Invitrogen, San Diego CA. Системы для экспрессии в клетках птиц также хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в патентах США № 5340740; 5656479; 5830510; 6114168 и 6500668; патенте Европы № EP 0787180B; патентной заявке Европы № EP03291813.8; WO 03/043415 и WO 03/076601. Аналогично бактериальные экспрессирующие системы и экспрессирующие системы в клетках млекопитающих также известны в данной области и описаны, например, в *Yeast Genetic Engineering* (Barr *et al.*, eds., 1989) Butterworths, London.

Рекомбинантные конструкции, кодирующие эктодомены белка F RSV, можно получать в пригодных векторах с использованием общепринятых способов. Множество пригодных векторов для экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых или млекопитающих хорошо известны и обычно применяются в данной области. Пригодные векторы могут содержать ряд компонентов, включая, но не ограничиваясь ими, один или более из следующих: ориджин репликации; ген селективного маркера; один или более элементов контроля экспрессии, таких как элемент контроля транскрипции (например, промотор, энхансер, терминатор), и/или один или более сигналов трансляции; и сигнальная последовательность или лидерная последовательность для нацеливания на секреторный путь в выбранной клетке-хозяине (например, происхождением из млекопитающих или из гетерологичного вида млекопитающих или вида не млекопитающих). Например, для экспрессии в клетках насекомых используют пригодный бакуловирусный экспрессирующий вектор, такой как pFastBac (Invitrogen), с получением рекомбинантных бакуловирусных частиц. Бакуловирусные частицы амплифицируют и используют для инфицирования клеток насекомых для экспрессии рекомбинантного белка. Для экспрессии в клетках млекопитающих, используют вектор, который запускает экспрессию конструкции в желаемой клетке-хозяине млекопитающего (например клетки яичника китайского хомячка).

Полипептиды эктодомена белка F RSV можно очищать с использованием любых пригодных способов. Например, способы очистки полипептидов эктодомена F RSV иммуноаффинной хроматографией известны в данной области. Ruiz-Arguello *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004). Пригодные способы очистки желаемых белков, включая осаждение и различные типы хроматографии, такие как хроматография гидрофобного взаимодействия, ионообменная, аффинная, хелатирующая и эксклюзионная хроматография, хорошо известны в данной области. Пригодные схемы очистки можно создавать с использованием двух или более из этих или других пригодных способов.

Если желательно, полипептиды эктодомена белка F RSV могут включать "метку", которая упрощает очистку, такую как эпитопная метка или HIS-метка. Такие меченые полипептиды можно стандартным образом очищать, например из кондиционированной среды, с помощью хелатирующей хроматографии или аффинной хроматографии.

5 Полипептиды F RSV также можно получать *in situ* путем экспрессии нуклеиновых кислот, которые кодируют их в клетках индивидуума, например, путем экспрессии самореплицирующейся РНК, описанной в настоящем документе.

Полипептиды могут включать дополнительные последовательности в дополнение к последовательностям RSV. Например, полипептид может включать
10 последовательность, упрощающую очистку (например, последовательность поли-His). Аналогично для целей экспрессии природный лидерный пептид белка F белок можно заменять отличающимся белком. Например, в ссылке 6 используется лидерный пептид мелиттина медоносной пчелы вместо природного пептида.

Форма и конформация полипептидов

15 Изобретение относится к иммуногенным композициям, которые включают любые из форм и конформаций полипептидов и белков F RSV, описанных в настоящем документе, включая любую желаемую комбинацию форм и конформаций полипептидов и белков F RSV, описанных в настоящем документе. Полипептид F RSV может представлять собой мономер или белок F RSV может представлять собой тример,
20 содержащий три мономерных полипептида. Тримеры могут быть монодисперсными или они могут быть в форме розеткообразных структур, например, вследствие взаимодействий между пептидами слияния отдельных тримеров. Иммуногенные композиции могут содержать полипептиды, которые представляют собой мономеры, тримеры, комбинацию мономеров и тримеров (например в состоянии динамического
25 равновесия), розеткообразные структуры тримеров и любую комбинацию указанных выше. Дополнительно как далее описано в настоящем документе белок F RSV может быть в конформации "после слияния", в конформации "до слияния" или в промежуточной конформации.

Белок F RSV может быть в конформации "до слияния", в конформации "после слияния"
30 или в промежуточной конформации. Полагают, что "конформация "после слияния" белка F RSV является низкоэнергетической конформацией нативного F RSV, и представляет собой тример, характеризующийся присутствием пучка с шестью спиралями, содержащего 3 области HRB и 3 области HRA. Конформация "после слияния" имеет характерную форму "вилки" или "метки для мяча в гольфе" при электронной
35 микроскопии. Конформация белка F RSV "до слияния" представляет собой конформацию, характеризующуюся тримером, который содержит двойную спираль, содержащую 3 области HRB. Пептид слияния в конформации "до слияния" не является экспонированным и, таким образом, конформации "до слияния", как правило, не образуют розеткообразных структур и имеют форму "леденца на палочке" или "шара
40 и стержня" при электронной микроскопии.

В некоторых аспектах белок F RSV имеет конформацию "после слияния". Например, белок F RSV может быть в форме монодисперсного тримера в конформации "после слияния" или в форме розеткообразной структуры, состоящей из тримеров "после слияния".

45 В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV представляет собой мономер. В некоторых вариантах осуществления полипептид F RSV представляет собой тример.

В других аспектах белок F RSV имеет конформацию "до слияния". Без связи с

конкретной теорией полагают, что конформация "до слияния" или промежуточные формы белка F RSV могут содержать эпитопы, которые являются такими же, как и эпитопы на белке F RSV, экспрессированном на природных вирионах RSV, и, таким образом, обеспечивают преимущества в отношении индукции нейтрализующих антител.

5 В некоторых аспектах изобретения используется полипептид, для которого не является предпочтительной конформация "после слияния" белка F. Предпочтительно, полипептиды (целиком или частично) экспонируют эпитоп белка F "до слияния" или эпитоп промежуточной конформации при превращении из конформации "до слияния" в конформацию "после слияния". Эти полипептиды могут представлять собой нативные
10 или мутантные белки F в состоянии "до слияния", они могут представлять собой нативные или мутантные белки F в промежуточной конформации или они могут представлять собой совокупность нативных или мутантных белков, где конформация "после слияния" не является предпочтительной или предпочтительно исключена. В некоторых случаях нативный или мутантный белок можно комбинировать с одной или
15 более дополнительными молекулами, которые способствуют поддержанию полипептидов в одном из указанных выше состояний, такими как моноклональные антитела, которое предпочтительно связывает конформацию "до слияния" или промежуточную конформацию. Дополнительно полипептиды могут представлять собой производные нативных белков F. Такие производные включают полипептиды,
20 содержащие один или более фрагментов нативного белка F, слитые полипептиды, содержащие нативный белок F (или его фрагмент) и гетерологичную последовательность, и полипептиды, содержащие нативную последовательность белка F, имеющую одну или более мутаций. Эти (или другие) модификации могут делать непредпочтительной конформацию "после слияния". Иллюстративные подходы для
25 того, чтобы сделать конформацию непредпочтительной, включают стабилизацию конформации "до слияния", стабилизацию промежуточной конформации, дестабилизацию конформации "после слияния" или увеличение барьера активации на одной или более стадиях, ведущих к конформации "после слияния".

В другом варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, который
30 экспонирует, по меньшей мере, один эпитоп, который является специфичным к конформации "до слияния" белка F или промежуточной конформации белка F. Эпитоп, который является специфическим для конформации "до слияния" белка F или промежуточной конформации белка F представляет собой эпитоп, который не присутствует в конформации "после слияния". Предпочтительно, чтобы, по меньшей
35 мере, один эпитоп стабильно присутствовал, например, эпитоп стабильно присутствовал в растворе в течение, по меньшей мере, двенадцати часов, по меньшей мере, одних суток, по меньшей мере, двух суток, по меньшей мере, четырех суток, по меньшей мере, шести суток, по меньшей мере, одной недели, по меньшей мере, двух недель, по меньшей мере, четырех недель, или, по меньшей мере, шести недель.

40 Такие полипептиды могут представлять собой нативные или мутантные белки F в состоянии "до слияния", в промежуточном состоянии или в совокупности состояний, где состояние "после слияния" представлено в небольшой степени или в более низком процентном количестве, чем в выделенных нативных белках F, или они могут представлять собой производное нативного белка F. Такие производные включают
45 полипептиды, содержащие один или более фрагментов нативного белка F, слитые полипептиды, содержащие нативный белок F (или его фрагмент) и гетерологичную последовательность, и полипептиды, содержащие нативную последовательность белка F, имеющую одну или более мутаций. Эти (или другие) модификации могут

стабилизировать аминокислотную последовательность белка F в его конформации "до слияния", стабилизировать аминокислотную последовательность белка F в промежуточной конформации, дестабилизировать конформацию "после слияния" аминокислотной последовательности белка F, увеличивать энергетический барьер при переходе, ведущем к конформации "после слияния" аминокислотной последовательности белка F, или приводить к комбинации двух или более из указанных выше.

ТМ- и/или СТ-домены белков F важны для стабильности конформации "до слияния" (8). Таким образом, эти домены обычно можно сохранять в иммуногенах в соответствии с изобретением. Поскольку может быть желательным не включать трансмембранные домены в растворимые иммуногены, функциональный эффект ТМ, тем не менее, может быть достигнут другими способами. Например, было подробно исследовано поведение до и после слияния белка F вируса парагриппа 5 (6), и авторы стабилизировали структуру ED "до слияния" путем слияния гетерологичного домена тримеризации с С-концом ED.

Домен олигомеризации

В другом варианте осуществления изобретения композиция может содержать полипептид (например, рекомбинантный полипептид), который содержит первый домен и второй домен, где (i) первый домен содержит белок F RSV (например эктодомен RSV, целиком или частично), и (ii) второй домен содержит гетерологичный домен олигомеризации. Второй домен обеспечивает олигомеризацию полипептида, тем самым, способствуя тому, что первый домен принимает состояние "до слияния" или промежуточное состояние. Полипептид предпочтительно присутствует в качестве олигомера, и, в частности, в качестве тримера.

Специалисту в данной области доступны различные домены олигомеризации. Они представляют собой последовательности аминокислот, которые формируют структуру, которая может взаимодействовать с доменами олигомеризации (либо с такими же, либо с отличающимися) в других полипептидах (либо в таких же, либо в отличающихся), так что несколько полипептидов могут связываться (как правило, нековалентно) с образованием олигомеров, например, тримеров. Например, тримеризации белка F ВИЧ (т.е. gp160) достигают слиянием с каталитической субъединицей

аспартаттранскарбамоилазы (ATCase) *E. coli*, которая в природе является стабильным тримером (9). Таким образом, эту субъединицу ATCase можно использовать с настоящим изобретением. Аналогично, тримеризацию белков F ВИЧ (10) и PIV5 (6) обеспечивают путем слияния их эктодоменов с GCNt. Таким образом, домен олигомеризации, используемый для настоящего изобретения, может содержать двойную спираль белка лейциновой молнии GCN4 дрожжей (11). Тримеризации эктодомена белка НА из вируса гриппа А достигают с использованием тримеризующей последовательности ("foldon") из фибритина бактериофага T4 (GSGYIPEAPRDGQ AYVRKDG EWVLLSTFL - SEQ ID NO: 19) (12). Таким образом, домен олигомеризации, используемый для настоящего изобретения, может содержать foldon.

Встречающиеся в природе олигомеры белков (как гетероолигомеры, так и гомоолигомеры) ассоциируют множеством различных путей, например, путем связывания β -слоев в различных мономерах, путем связывания α -спиралей в различных мономерах, путем связывания гидрофобных участков поверхности, и т.д. Одним общим структурным мотивом, вовлеченным в олигомеризацию белков, является двухспиральный домен. Спиральный структурный домен α -спирали может сам по себе формировать спирали, и две, три, четыре или пять α -спиралей могут оборачиваться вокруг друг друга с образованием левовращающей суперспирали, известной как "двойная спираль", хотя были получены искусственные правовращающие суперспирали

(13-19). Простота двухспирального домена сделала его популярным выбором для конструирования химерных белков с определенными состояниями олигомеризации (16).

В структуре двойной спирали α -спирали взаимодействуют через гидрофобные остатки, которые формируют аполярную ленту вдоль одной стороны каждой спирали, и также могут существовать стабилизирующие электростатические взаимодействия между боковыми цепями каждой стороны этой ленты. В семичленном повторе abcdefg в α -спирали, аполярная лента определяется гидрофобными боковыми цепями остатков a и d, а какие-либо электростатические взаимодействия происходят, главным образом, в остатках e и g. Положение a наиболее часто представляет собой Leu, Ile или Ala и положение d обычно представляет собой Leu или Ala. Остатки e и g часто представляют собой Glu или Gln, а Arg и Lys являются также частыми в положении g. Заряженные остатки часто встречаются в положениях b, c и f, поскольку эти остатки контактируют с растворителем. Однако существуют исключения для этого общего семичленного паттерна и в этом семичленном повторе часто встречаются остатки Pro. Такие исключения обычно имеют функциональное значение, включая, в качестве примера, дестабилизацию домена олигомеризации для обеспечения повторного сворачивания и перестройки, такие как происходят в белке F.

В данной области известны сотни последовательностей двухспиральных доменов, и любую пригодную последовательность можно использовать в качестве домена олигомеризации в соответствии с изобретением, при условии что он сохраняет способность олигомеризоваться с другими двухспиральными доменами и что он не нарушает функцию других доменов в полипептиде. Предпочтительно использовать двухспиральный домен, который встречается внеклеточно (20) и который в природе действует как домен олигомеризации. В качестве альтернативы применению природного двухспирального домена можно использовать искусственные двухспиральные домены (21, 22). Благодаря в высокой степени повторяющейся структуре двухспирального домена, домен особенно хорошо поддается компьютерному моделированию, поскольку каркасные части каждого аминокислотного остатка могут быть параметризованы вместо обработки каждой каркасной части в качестве уникального элемента с его собственными переменными. Домен (b) может включать последовательность лейциновой молнии или последовательность аланиновой молнии (23).

Двухспиральный домен, используемый в полипептиде по изобретению, предпочтительно представляет собой домен, который формирует тример, так что полипептид в соответствии с изобретением также может собираться в тример. Предпочтительными двухспиральными доменами являются домены, взятые из бактериальных трансмембранных белков. Предпочтительной подгруппой трансмембранных белков являются адгезины (т.е. белки клеточной поверхности, которые опосредуют адгезию к другим клеткам или к поверхностям), и в частности нефимбриальные адгезины (например, в семействе олигомерных двухспиральных адгезинов или "Оса"). Конкретные последовательности для применения по изобретению включают последовательности, описанные в ссылке 24, из адгезина YadA *Yersinia enterocolitica*, адгезина NadA *Neisseria meningitidis*, поверхностного белка UspA2 *Moraxella catarrhalis*, и других адгезинов, таких как адгезин HadA из *Haemophilus influenzae* биологической группы *aegyptius* и т.д. (SEQ ID NO: 28-31 и 42-58 источник литературы 24). Дополнительно эукариотический фактор транскрипции теплового шока имеет двухспиральный домен тримеризации, который может отдельно экспрессировать и, таким образом, может быть использован в соответствии с изобретением.

В аминокислотной последовательности полипептида, имеющего двухспиральную область, структура α -спиралей в виде семичленных повторов означает, что граница двухспирального домена может быть определена с некоторой точностью, однако точный остаток, обозначающий как конец двухспиральной структуры, нельзя назвать с абсолютной точностью. Однако это отсутствие абсолютной точности не является проблемой для осуществления изобретения на практике, поскольку стандартное тестирование может выявить, необходим ли в двойной спирали какой-либо аминокислотный остаток, для которого может существовать сомнение. Тем не менее, для изобретения не требуется, чтобы границы были известны с абсолютной точностью, поскольку единственным основным требованием для изобретения является то, чтобы двухспиральный домен функционировал так, чтобы обеспечивалась олигомеризация полипептида с другими двухспиральными доменами без нарушения функции других доменов в полипептиде.

Другой класс домена олигомеризации, который можно использовать по изобретению, встречается в левовращающей тройной спирали, известной как коллагеновая спираль (25). Эти формирующие тройную спираль последовательности вовлекают

последовательность основного трипептидного повтора $^1\text{Gly}-^2\text{Xaa}-^3\text{Xaa}$, где ^2Xaa часто представляет собой Pro, и ^3Xaa часто представляет собой 4-гидроксипролин. Хотя этот мотив известен как "коллагеновая" спираль, он встречается во многих белках помимо просто коллагена. Таким образом, домен олигомеризации может представлять собой последовательность, содержащую множество повторов мотива с последовательностью $^1\text{Gly}-^2\text{Xaa}-^3\text{Xaa}$, которая сворачивается в форме спиральной структуры, которая может олигомеризоваться с соответствующими спиральными структурами в других полипептидных цепях.

Коллаген также обеспечивает другой класс домена олигомеризации. В ссылке 26 описан мотив, встречающийся в неколлагеновом домене 1 (NC1) коллагена типа X, и этот мотив может быть использован для образования тримера и мультимера более высокого порядка без тройной спирали. Эта тримерная сборка является высоко термостабильной без межмолекулярных дисульфидных связей. Таким образом, домен олигомеризации может содержать последовательность NC1.

Другие домены олигомеризации могут происходить из трансмембранных доменов олигомерных ТМ-белков. Поскольку они обычно являются липофильными, гидрофобные остатки, расположенные вне их ТМ-областей, можно заменять заряженными остатками с получением растворимого домена. Такие способы сольubilизации трансмембранных доменов способами белковой инженерии известны в данной области, например из ссылки 27. Этот способ также используют для GCN4, где положения "a" и "d" в семичленном повторе заменены изолейцином (11): KQIEDKIEEILSKIYNIENEIARIKKL IGEA (SEQ ID NO: 20). Пригодные последовательности двойной спирали для применения в домене олигомеризации обычно имеют длину от 20 до 35 аминокислот, например от 23 до 30 аминокислотных остатков.

Домены олигомеризации, используемые для изобретения, как правило, могут поддерживать олигомерную структуру без необходимости в образовании межмолекулярных дисульфидных мостиков, однако олигомеры, содержащие связанные дисульфидной связью мономеры, не исключаются из изобретения.

В качестве альтернативы или дополнительно к применению домена олигомеризации для стабилизации белка F в его конформации "до слияния", можно использовать мутацию. Например, в ссылке 28 описано, что мутация в консервативной области

субъединицы F2 белков F в вирусе обезьян 5 или вирусе Хендра может влиять на стабильность конформации "до слияния".

В некоторых случаях также для способствования конформации "до слияния" можно использовать низкое значение pH.

5 Стабилизация тримера домена HRB

В другом предпочтительном аспекте настоящего изобретения конформацию белка F "после слияния" можно делать неpreferred путем стабилизации тримера домена HRB. Домен HRB формирует тройную спираль в форме "до слияния" и, вероятно, в промежуточной форме. Как рассмотрено в предыдущем разделе, вследствие их простоты, двойные спирали широко исследованы в качестве модельных систем для межмолекулярных взаимодействий между белками и в качестве модельных систем для внутримолекулярных взаимодействий на увеличенных расстояниях (т.е. взаимодействий третичной структуры). Эти исследования пригодны в обучающих способах, которые можно использовать для стабилизации домена HRB в форме тримерной спирали. В качестве примера, один или более остатков в положениях *a* и/или *d* семичленного повтора могут быть замещены остатками, которые способствуют образованию стабильных тримерных спиралей, такие как остатки Ile. Дополнительно хотя и менее предпочтительно, наpreferred ионные взаимодействия в положениях *e* и *g* можно устранять или можно добавлять preferred ионные взаимодействия в положениях *e* и *g*.

Предпочтительная область домена HRB для манипулирования представляет собой семичленный повтор между P484-N517. Preferred примерами остатков *a* и *d* в качестве мишеней для мутации являются F488, I492, V495, I499, S502, I506, S509, L512, и V516. Остатки серина являются особенно preferred, поскольку замена гидрофильных остатков гидрофобными остатками стабилизирует гидрофобное ядро двойной спирали. Другой preferred мишенью может быть фенилаланин, заменяемый меньшим гидрофобным остатком, который лучше упаковывается в ядре, таким как изолейцин.

30 Дестабилизация тримера домена HRA

В другом предпочтительном аспекте настоящего изобретения конформацию "после слияния" белка F можно делать неpreferred путем стабилизации тримера домена HRA. Домен HRA формирует трехцепочечную спираль в форме "после слияния" и, возможно, в одной или более промежуточных формах. В качестве примера, один или более остатков в положениях *a* и/или *d* семичленного повтора можно заменять остатками, которые делают неpreferred образование стабильных тримерных спиралей. Дополнительно хотя и менее предпочтительно, можно удалять preferred ионные взаимодействия в положениях *e* и *g* или можно добавлять неблагоприятные ионные взаимодействия в положениях *e* и *g*. Preferred, выбирают такие мутации, которые обладают минимальным влиянием на стабильность домена HRA в конформации "до слияния", что можно смоделировать на основе доступных кристаллических структур белка PIV5 F в формах "до слияния" и "после слияния".

Другие модификации

В дополнение к указанным выше модификациям, могут быть далее разработаны модификации на основе молекулярного моделирования белков F hRSV, исходя из доступных кристаллических структур белка F PIV5 в форме "до слияния" и "после слияния". Можно вносить мутации, которые дестабилизируют конформацию "после слияния", такую как сворачивание 6НВ доменов HRA и HRB, или которые стабилизируют

конформацию "до слияния", такую как сворачивание HRA в конформации "до слияния". Дополнительно можно увеличивать энергетический барьер переходов, ведущих к конформации "после слияния". Хотя специалисту в данной области понятно, что стабилизация исходной конформации или дестабилизация конечной конформации могут
 5 иметь эффект увеличения энергетического барьера, можно вносить другие модификации, которые влияют на само переходное состояние.

В качестве дополнительного примера аминокислоты, N-концевые для домена HRB (приблизительно а.к. 449-482, предпочтительно V459-F483) действуют в качестве "привязи", которая позволяет домену HRB сдвигаться с одной стороны тримера белка F на другую сторону, так чтобы домен HRB мог участвовать в 6НВ в конформации
 10 "после слияния". Делеция одной или более из этих аминокислот нарушает или полностью препятствует участию домена HRB в сворачивании 6НВ в конформации "после слияния" белка F (см. ФИГ. 3). Дополнительно взаимодействие между "привязью" и белком F в конформации "до слияния" можно стабилизировать для предотвращения оттягивания
 15 "привязи" для обеспечения участия домена HRB в сворачивании 6НВ. Примерами стабилизирующих мутаций, которые можно вносить, являются цистеиновые мостики между "привязью" и частью белка F, с которой "привязь" контактирует в конформации "до слияния".

Другим примером является стабилизация HRA в конформации "до слияния" (остатки
 20 T50-Y306). Вновь, исходя из кристаллических структур гомологичных белков F, гидрофобное ядро можно стабилизировать путем замены погруженных гидрофильных или ионных остатков гидрофобными остатками сходного размера. Также на поверхность или в ядро можно вносить цистеиновые мостики. Дополнительно как продемонстрировано с помощью тщательного анализа кристаллической структуры
 25 мутантов с лизоцимом, гидрофобные ядра или белки являются относительно жесткими и, таким образом, внесение углублений предсказуемо дестабилизировало мутанты лизоцима. Аналогично, повторное упаковывание белка F в конформации "до слияния" для устранения каких-либо естественных углублений может стабилизировать белок F в формах "до слияния" или в промежуточной форме, таким образом, делая
 30 непредпочтительной конформацию "после слияния".

Способы получения композиций

Изобретение относится к способам получения композиций и к композициям, которые содержат белок F RSV, в частности, растворимые полипептиды эктодомена F RSV, включая иммуногенные композиции. Предпочтительно полипептиды эктодомена F
 35 RSV находятся в единой форме, такой как нерасщепленные мономеры, нерасщепленные тримеры, расщепленные тримеры, розеткообразные структуры расщепленных тримеров, или в состоянии динамического равновесия между подгруппой таких форм (например в состоянии динамического равновесия между нерасщепленными мономерами и нерасщепленными тримерами). Изобретение имеет несколько преимуществ. Например,
 40 как описано в настоящем документе, изобретение относится к способам получения композиций, которые содержат преобладающую желаемую форму белка F RSV, или единичную желаемую форму белка F RSV, такую как нерасщепленные мономеры, нерасщепленные тримеры, расщепленные тримеры, розеткообразные структуры расщепленных тримеров, подгруппу таких форм в состоянии динамического равновесия
 45 (например равновесие между нерасщепленными мономерами и нерасщепленными тримерами) или смесь желаемых форм белка F RSV. Эти типы композиций можно использовать для различных целей, например, в изготовлении иммуногенных композиций, которые можно использовать для получения вакцин. Присутствие

единичной желаемой формы F RSV или известных форм в состоянии динамического равновесия в иммуногенной композиции обеспечивает более предсказуемый состав, растворимость и стабильность, и более предсказуемый иммунный ответ, когда композицию вводят индивидууму.

5 Когда полипептиды эктодомена белка F RSV получают общепринятой рекомбинантной экспрессией в клетках-хозяевах, полипептиды расщепляются в участках расщепления фурином приблизительно в положении 109/110 и приблизительно в
10 положении 136/137 в ходе продукции в клетке-хозяине перед их секрецией в культуральную среду. Расщепление полипептидов клетками-хозяевами позволяет повторное сворачивание полипептидов эктодомена белка F RSV, что приводит к экспонированию гидрофобного пептида слияния. Таким образом, расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, вследствие присутствия экспонированного пептида слияния, образуют розеткообразные структуры и связываются с липидами и
15 липопротеинами, которые происходят из клеток-хозяев и культуральной среды. В действительности, электронная микроскопия расщепленного эктодомена F RSV, образовавшегося в клетках насекомых и очищенного с помощью HIS₆-метки, показала, что полипептиды имели форму вилки, согласующуюся с формой "после слияния", и были связаны с тем, что выглядело как остаточный клеточный дебрис. Таким образом, традиционной рекомбинантной экспрессией в клетках-хозяевах нельзя легко получить
20 в высокой степени чистые препараты розеткообразных структур и других форм и конформаций полипептидов эктодомена белка F RSV.

Способы получения расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV

В одном аспекте изобретение относится к способу получения композиции, которая содержит расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV. Как правило, способ
25 вовлекает предоставление нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, а затем расщепление их с получением субъединицы F₁ и субъединицы F₂. Как описано в настоящем документе, нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно легко очищать и отделять от загрязняющих липидов и липопротеинов с использованием
30 пригодных способов, таких как эксклюзионная хроматография. Без связи с конкретной теорией, полагают, что гидрофобный пептид слияния не экспонируется в нерасщепленных полипептидах эктодомена белка F RSV и, таким образом, нерасщепленные полипептиды не ассоциируют с примесями липидов и липопротеинов. Как далее описано в настоящем документе, нерасщепленные эктодомены белка F RSV можно расщеплять с получением субъединиц F₁ и F₂, которые можно очищать в качестве
35 тримеров, розеткообразных структур тримеров или смеси тримеров и розеткообразных структур тримеров.

Нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно получать с использованием любого пригодного способа, например, путем рекомбинантной
40 продукции в клетках-хозяевах, которые не содержат активный фурин или фурин-подобные протеазы в то время, когда продуцируются полипептиды эктодомена белка F RSV. Для достижения этого способа продукции можно использовать множество способов, таких как продукция в рекомбинантных клетках, подвергнутых мутации для предупреждения экспрессии фурина или фурин-подобной протеазы (в зависимости от
45 условий или полный "нокаут"), и различные способы, которые снижают или препятствуют экспрессии фурина или фурин-подобных протеаз в клетках-хозяевах, например, с использованием РНК-интерференции или других сходных способов, или ингибирования активности фурина или фурин-подобных протеаз в клетках-хозяевах с

использованием ингибиторов протеаз.

Нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV предпочтительно получают рекомбинантной экспрессией конструкций, которые кодируют эктодомен белка F RSV, в котором аминокислотная последовательность участков расщепления фурином изменена, так что полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются клеткой-хозяином, которая продуцирует нерасщепленные полипептиды. Нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно получать с использованием любой пригодной клетки-хозяина, такой как клетки насекомых (например *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*), клетки млекопитающих (например, человек, не являющийся человеком примат, лошадь, корова, овца, собака, кошка и грызун (например хомяк)), клетки птиц (например курицы, утки и гуся), клетки бактерий (например, *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Streptococcus* spp.), клетки дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Yarrowia lipolytica*), клетки *Tetrahymena* (например, *Tetrahymena thermophila*) или их комбинации. В данной области известно множество клеток насекомых и клеток млекопитающих. Пригодные клетки насекомых включают, например, клетки Sf9, клетки Sf21, клетки Tn5, клетки Schneider S2 и клетки High Five (клональный изолят, происходящий из исходной клеточной линии *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen)). Пригодные клетки млекопитающих включают, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки эмбриона человека (клетки HEK293, как правило, трансформированные расщепленной ДНК аденовируса 5 типа), клетки NIH-3T3, клетки 293-T, клетки Vero, клетки HeLa, клетки PERC.6 (номер депонированного образца ECACC 96022940), клетки Hep G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), фетальные клетки легкого макака-резус (ATCC CL-160), клетки почки быка Madin-Darby ("MDBK"), клетки почки собаки Madin-Darby ("MDCK") (например, MDCK (NBL2), ATCC CCL34; или MDCK 33016, DSM ACC 2219), клетки почки детенышей хомячка (ВНК), такие как ВНК21-F, НКСС и т.п. Пригодные клетки птиц включают, например, эмбриональные стволовые клетки курицы (например клетки EBx®), эмбриональные фибробласты курицы, эмбриональные половые клетки курицы, клетки утки (например клеточные линии AGE1.CR и AGE1.CR.pIX (ProBioGen), которые описаны, например, в *Vaccine* 27:4975-4982 (2009) и WO2005/042728), клетки EB66 и т.п.

Пригодные экспрессирующие системы в клетках насекомых, такие как бакуловирусные системы, известны специалистам в данной области и описаны, например, в Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* № 1555 (1987). Материалы и способы для системы для экспрессии бакуловирус/насекомое представляют собой коммерчески доступный набор от, среди прочего, Invitrogen, San Diego CA. Системы для экспрессии в клетках птиц также хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в патентах США № 5340740; 5656479; 5830510; 6114168 и 6500668; патенте Европы № EP 0787180B; патентной заявке Европы № EP03291813.8; WO 03/043415 и WO 03/076601. Аналогично бактериальные экспрессирующие системы и экспрессирующие системы в клетках млекопитающих также известны в данной области и описаны, например, в *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, London.

Как правило, аминокислотную последовательность нерасщепленного эктодомена белка F RSV изменяют для предотвращения расщепления по участкам расщепления фурином приблизительно в положении 109/110 и приблизительно в положении 136/137, но она содержит природный или внесенный участок расщепления протеазой, который,

при расщеплении, дает субъединицу F₁ и субъединицу F₂. Например, нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV может иметь аминокислотную последовательность, которая изменена для предотвращения расщепления по участкам расщепления фурином приблизительно в положении 109/110 и приблизительно в положении 136/137, но
 5 содержит один или более природных или внесенных участков расщепления протеазой от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161.

Специалист в данной области может легко разработать и представить себе множество конкретных аминокислотных последовательностей, которые обеспечат продукцию и экспрессию клетками-хозяевами нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F
 10 RSV, включая аминокислотные последовательности, которые не расщепляются в участках расщепления фурином в положении приблизительно 109/110 и в положении приблизительно 136/137. Как правило, одна или более аминокислот, которые являются частью или расположены рядом с участками расщепления фурином в положении
 15 приблизительно 109/110 и в положении приблизительно 136/137 независимо заменены или удалены. Известны некоторые аминокислотные замены и делеции, которые пригодны для предотвращения расщепления полипептидов эктодомена белка F RSV. Например, замены R108N, R109N, R108N/R109N, которые ингибируют расщепление в
 положении 109/110, и замена K131Q или делеция аминокислот в положениях 131-134, которая ингибирует расщепление в положении 136/137, описаны Gonzalez-Reyes *et al.*,
 20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:9859-9864 (2001). Описан нерасщепленный полипептид эктодомена F RSV, который содержит аминокислотные замены R108N/R109N/ K131Q/ R133Q/ R135Q/R136Q Ruiz-Arguello *et al.*, *J. Gen. Virol.* 85:3677687 (2004). Как подробно описано в настоящем документе, дополнительные аминокислотные последовательности
 25 белка F RSV, которые приводят к полипептиду эктодомена F RSV, секретируемому клеткой-хозяином в нерасщепленной форме, содержат измененные участки расщепления фурином, например, измененные аминокислотные последовательности в положениях
 приблизительно 106-109 и в положениях приблизительно 133-136. Измененные участки расщепления фурином содержат, по меньшей мере, одну аминокислотную замену или
 30 делецию в положениях приблизительно 106-109, и, по меньшей мере, одну аминокислотную замену или делецию в положениях приблизительно 133-136.

Аналогично, являются возможными и можно легко разработать и представить себе множество конкретных аминокислотных последовательностей нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, которые содержат участок расщепления
 35 протеазой (например встречающийся в природе или встроенный), который при расщеплении образует первую субъединицу, которая содержит F₁, и вторую субъединицу, которая содержит F₂. Например, аминокислотная последовательность белка F RSV от
 приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 содержит участки расщепления трипсином, и один или более участков расщепления трипсином можно
 40 расщеплять трипсином с образованием субъединиц F₁ и F₂. Если желательно в нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV можно встраивать один или
 более пригодных участков распознавания протеазой, например, от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161. Встроенные участки распознавания
 протеазой можно расщеплять с использованием соответствующей протеазы с
 45 получением субъединиц F₁ и F₂. Когда в аминокислотную последовательность нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV вносят участок распознавания
 протеазы, предпочтительно, чтобы участок распознавался протеазой, которая не расщепляет эктодомен встречающегося в природе белка F RSV.

Способ согласно этому аспекту изобретения включает: а) предоставление нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, содержащих участок расщепления протеазой, который при расщеплении образует субъединицы F₁ и F₂, и б) расщепление нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV протеазой, которая распознает участок расщепления протеазой. Как правило, аминокислотная последовательность нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, и полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их в нерасщепленном виде по участкам расщепления фурином приблизительно в положениях 106-109 и приблизительно в положениях 131-136.

Предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно очищать до желаемой степени. Например, предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV могут быть предоставлены в качестве клеточного лизата, гомогената клеток или кондиционированной клеточной культурой среды, которая по существу не переработана (например, не переработана или только процежена), или в частично или по существу очищенной форме. В конкретных примерах предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV предоставляют в кондиционированной клеточной культурой среде, выбранной из группы, состоящей из кондиционированной клетками насекомых среды, кондиционированной клетками млекопитающих среды, кондиционированной клетками птиц среды, кондиционированной клетками дрожжей среды, кондиционированной клетками *Tetrahymena* среды и их комбинаций.

Обычно предпочтительно, чтобы предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV были очищенными, например, очищенными так, чтобы они были, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенными. Как описано в настоящем документе, нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно легко очищать от липидов и липопротеинов, в то время как полученные традиционным способом расщепленные формы белка F RSV очищаются совместно с примесями липидов и липопротеинов. Таким образом, когда предоставляют очищенные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, способ можно использовать для легкого получения композиции, содержащей расщепленные эктодомены белка F RSV, которые по существу не содержат липидов или липопротеинов.

Пригодные способы расщепления полипептидов с использованием протеазы хорошо известны и повсеместно приняты в данной области. Как правило, полипептиды, подлежащие расщеплению, комбинируют с достаточным количеством протеазы в условиях (например, pH, концентрация полипептида и протеазы, температура), пригодных для расщепления полипептида. Многие пригодные протеазы являются коммерчески доступными, и пригодные условия для проведения расщепления полипептидов хорошо известны для многих протеаз. Если желательно, расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV после расщепления протеазой можно очищать.

В одном примере способа предоставляют нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат неизмененный пептид слияния, такие как нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV, в котором ни одна из аминокислот в положениях 137-154 не замещена или не удалена. В некоторых вариантах осуществления предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV являются очищенными. Предоставленные нерасщепленные полипептиды

эктодомена белка F RSV, которые содержат неизмененный пептид слияния, расщепляют, и расщепление приводит к образованию розеткообразных структур тримеров расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. Если желательно, розеткообразные структуры можно далее очищать с использованием любого пригодного

5 способа, такого как эксклюзионная хроматография.

В другом примере способа предоставляют нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния, такой как нерасщепленный пептид эктодомена белка F RSV, в котором приблизительно аминокислоты 137-152, приблизительно аминокислоты 137-153, приблизительно аминокислоты 137-145 или

10 приблизительно аминокислоты 137-142 удалены. Также описаны другие пригодные делеции пептида слияния, такие как делеция аминокислот в положениях 137-146. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

В некоторых вариантах осуществления предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV являются очищенными. Предоставленные

15 нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV расщепляют, и расщепление приводит к образованию тримеров расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. Если желательно, тримеры можно далее очищать с использованием любых пригодных способов, таких как эксклюзионная хроматография.

В конкретных примерах способа предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV включают, по меньшей мере, один полипептид, выбранный из группы, состоящей из furdel и delp23 furdel (например, гомогенный расщепляемый трипсином furdel, гомогенный расщепляемый трипсином delp23 furdel или смесь

расщепляемого трипсином furdel и расщепляемого трипсином delp23 furdel). Предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV расщепляют,

25 например трипсином, и расщепление приводит к образованию расщепленных тримеров, розеткообразных структур расщепленных тримеров или комбинации расщепленных тримеров и розеткообразных структур расщепленных тримеров полипептидов эктодомена белка F RSV. Если желательно, расщепленные тримеры и/или розеткообразные структуры расщепленных тримеров можно далее очищать с

30 использованием любых пригодных способов, таких как эксклюзионная хроматография.

Способы получения нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV

В другом аспекте изобретение относится к способу получения композиции, которая содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV. Как правило, способ

35 вовлекает предоставление биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда, а затем очистку нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. Как описано в настоящем документе, было открыто, что очищенные мономеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV могут подвергаться самосборке с образованием

40 нерасщепленных тримеров, и что существует смесь нерасщепленных мономеров и нерасщепленных тримеров или равновесное состояние нерасщепленных мономеров и нерасщепленных тримеров. Без связи с конкретной теорией полагают, что равновесие направлено в сторону мономера, но что в концентрированных растворах равновесие может сдвигаться в сторону тримера.

45 Способ согласно этому аспекту изобретения включает: а) предоставление биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда; и б) очистку мономеров, тримеров

или комбинации мономеров и тримеров нерасщепленных полипептидов эктодоменов белка F RSV из биологического материала. В некоторых вариантах осуществления очищают мономеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, или очищают тримеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, или

5 очищают мономеры и тримеры.

Как правило, аминокислотная последовательность нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, и полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их в нерасщепленном виде от приблизительно положения 101 до

10 приблизительно положения 161 (включая участки расщепления фурином в положениях 106-109 и 131-136). В более конкретных примерах биологический материал, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, включает, по меньшей мере, один полипептид, выбранный из группы, состоящей из furmt, furdel, delp21 furx, delp23 furx, delp21 furdel, delp23 furdel и конструкции factor Ха, которую можно расщеплять

15 с использованием фактора Ха.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, и участки расщепления другой протеазой (например участки расщепления трипсином) от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161

20 изменены или удалены для предотвращения расщепления протеазой (например трипсином). Например, хорошо известно, что трипсин расщепляет после остатков лизина и аргинина. В определенных предпочтительных вариантах осуществления аминокислотная последовательность нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, один или более остатков

25 лизина и/или аргинина (например, все остатки лизина и аргинина), присутствующие от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 удалены или заменены аминокислотой, которая не является лизином или аргинином, полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их нерасщепленными от приблизительно положения 101 до приблизительно положения

30 161, и полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161. Предпочтительно, полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином, когда 1 мг/мл раствора полипептида эктодомена белка F RSV (разбавленного в 25 mM Tris, pH 7,5, 300 mM NaCl) обрабатывают объемом раствора трипсина в соотношении один к тысяче

35 (трипсин из плазмы быка, разбавленный до концентрации 1 мг/мл в 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl; конечное отношение масс в реакционной смеси для расщепления составляет 0,001:1 трипсин:эктодомен F RSV; трипсин используется в количестве 10-15 BAEE единиц на мг белок) в течение 1 часа при 37°C.

Если желательно, нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV (например

40 полипептиды, которые содержат измененные участки расщепления фурином, и полипептиды, которые содержат измененные участки расщепления фурином и измененные участки расщепления трипсином), могут дополнительно содержать измененный пептид слияния, как например, нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV, в котором, например, удалены приблизительно аминокислоты 137-152,

45 удалены приблизительно аминокислоты 137-154, удалены приблизительно аминокислоты 137-145 или удалены приблизительно аминокислоты 137-142. Также описаны другие пригодные делеции пептида слияния, такие как делеция аминокислот в положениях 137-146. Ruiz-Arguello et al., *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

В конкретных вариантах осуществления способ включает: а) предоставление биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда, где аминокислотная

последовательность нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином, остатки лизина и аргинина, присутствующие от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 удалены или заменены аминокислотой, которая не является лизином или аргинином, полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их в нерасщепленном виде от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161, и полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином от приблизительно положение 101 до приблизительно положения 161; и б) очистку мономеров, тримеров или комбинаций мономеров и тримеров нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала.

В более конкретных примерах биологический материал, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, включает, по меньшей мере, один полипептид, выбранный из группы, состоящей из Furx, Furx R113Q K123N K124N, delp21 furx и delp23 furx.

В других конкретных вариантах осуществления способ включает: а) предоставление биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, в которых пептид слияния подвергнут мутации (например, по меньшей мере, часть пептида слияния удалена), такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда; и б) очистку нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала.

Нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV может содержать измененные участки расщепления фурином, и полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки-хозяина, которая продуцирует их в нерасщепленном виде от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 (в том числе в участках расщепления фурином в положениях 106-109 и 131-136). Если желательно, нерасщепленный полипептид эктодомена белка F RSV с измененными участками расщепления фурином дополнительно содержит измененные или удаленные участки для других протеаз (например участки расщепления трипсином) от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 для предотвращения расщепления протеазой (например трипсином). Например, один или более остатков лизина и/или аргинина (например, все остатки лизина и аргинина), присутствующих от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 удалены или заменены аминокислотой, которая не является лизином или аргинином, и полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161.

Мономеры, тримеры и комбинации мономеров и тримеров нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV можно очищать до желаемой степени. Как правило, предпочтительно, чтобы мономеры или тримеры нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV были очищенными, например, чтобы они были, по меньшей мере, приблизительно на 75%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенными. Как описано в настоящем документе, нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно легко очищать от липидов и липопротеинов, например, эксклюзионной хроматографией.

Таким образом, способ можно использовать для легкого получения композиции, содержащей мономеры, тримеры или комбинацию мономеров и тримеров расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, которые по существу свободны от липидов и липопротеинов.

В одном примере способ включает предоставление кондиционированной культурой клеток насекомых среды, кондиционированной культурой клеток млекопитающих среды, кондиционированной культурой клеток птиц среды, кондиционированной клеткам *Tetrahymena* среды, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления тримеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления мономеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления мономеры и тримеры нерасщепленного полипептида эктодомена белка F RSV очищают.

Способы получения расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV с измененными пептидами слияния

В одном аспекте изобретение относится к способу получения композиции, которая содержит расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, который содержит измененный пептид слияния. Когда в клетках-хозяевах экспрессируются полипептиды эктодомена белка F RSV, которые не содержат измененные участки расщепления фурином, клетки-хозяева процессируют полипептиды, отчасти, расщепляя полипептид в участках расщепления фурином в положениях приблизительно 109/110 и в положениях приблизительно 136/137 с образованием субъединиц F₁ и F₂. Процессированные полипептиды секретируются в культуру и их можно выделять в качестве связанных субъединиц F₁-F₂ (например, субъединиц F₁ и F₂ с дисульфидными связями), которые могут формировать розеткообразные структуры тримеров путем агрегации экспонированных пептидов слияния. Полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененные пептиды слияния, можно получать в клетках-хозяевах и секретировать из клеток-хозяев в качестве ассоциированных субъединиц F₁-F₂, и они не агрегируют в розеткообразные структуры или с примесями липидов или липопротеинов. Без связи с конкретной теорией полагают, что полипептиды не формируют розеткообразные структуры или не ассоциируют с примесями липидов и липопротеинов, поскольку измененный пептид слияния не опосредует агрегацию.

Способ согласно этому аспекту изобретения включает: а) предоставление биологического материала, который содержит расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния (например, по меньшей мере, часть пептида слияния удалена), такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда; и b) очистку расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала. Очищенные расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV можно очищать в качестве расщепленных тримеров, розеткообразных структур расщепленных тримеров или смеси расщепленных тримеров и розеткообразных структур расщепленных тримеров. Пригодные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененные пептиды слияния, содержат расщепляемые участки расщепления фурином в положении приблизительно 109/110 и приблизительно 136/137 и дополнительно содержат измененный пептид слияния, как описано в настоящем документе. Например, в способе можно использовать полипептид эктодомена белка F RSV, в котором удалены приблизительно аминокислоты 137-152, удалены приблизительно аминокислоты 137-153, удалены приблизительно аминокислоты 137-145, удалены приблизительно

аминокислоты 137-146 или удалены приблизительно аминокислоты 137-142. В конкретных примерах биологический материал, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, включает по меньшей мере делецию пептида слияния 1.

- 5 Расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV (например, расщепленные тримеры или смесь расщепленных тримеров и розеткообразных структур расщепленных тримеров) можно очищать до желаемой степени. Главным образом, предпочтительно, чтобы расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV были очищенными, например, чтобы они были, по меньшей мере, приблизительно на 75%, по меньшей
- 10 мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенными. Как описано в настоящем документе, расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния, можно легко очищать от липидов и липопротеинов, например, эксклюзионной хроматографией.
- 15 Таким образом, способ можно использовать для легкого получения композиции, содержащей тримеры, розеткообразные структуры расщепленных тримеров или комбинацию расщепленных тримеров и розеткообразных структур расщепленных тримеров, которые по существу свободны от липидов и липопротеинов.

Способы получения полипептидов эктодомена белка F RSV с С-концевыми мутациями участка расщепления фурином

- 20 В другом аспекте изобретение относится к способу получения композиции, которая содержит не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена RSV и к способу получения расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. Без связи с конкретной теорией полагают, что нерасщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F
- 25 RSV расщепляются клетками, которые продуцируют белки, в участке расщепления фурином приблизительно в положении 109/110, но не расщепляются в участке расщепления фурином приблизительно в положении 136/137, и секретируются в среду в качестве субъединицы F₁, связанной с субъединицей F₂. Дополнительно полагают, что гидрофобный пептид слияния в не расщепленных на С-конце полипептидах
- 30 эктодомена белка F RSV не экспонируется и, таким образом, не расщепленные на С-конце полипептиды не связываются с примесями липидов и липопротеинов. Как далее описано в настоящем документе, не расщепленные на С-конце эктодомены белка F RSV можно далее расщеплять с получением субъединицы F₁, в которой N-конец
- 35 расположен от положения 110 до приблизительно положения 161, которая связана с субъединицей F₂. Такие субъединицы F₁ и F₂ можно очищать в качестве тримеров, розеткообразных структур тримеров или смеси тримеров и розеткообразных структур тримеров.

- 40 Как правило, аминокислотная последовательность не расщепленного на С-конце эктодомена белка F RSV изменена для предотвращения расщепления в участке расщепления фурином в положении приблизительно 136/137, но содержит встречающийся в природе или встроенный участок расщепления протеазой, который, при расщеплении, образует субъединицу F₁, в которой N-конец расположен с положения 110 до приблизительно положения 161, и субъединицу F₂. Например, не расщепленный
- 45 на С-конце полипептид эктодомена белка F RSV может иметь аминокислотную последовательность, которая изменена для предотвращения расщепления в участках расщепления фурином в положении приблизительно 136/137, но содержит один или более встречающихся в природе или встроенных участков расщепления протеазой от

приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161. В конкретном примере аминокислотная последовательность не расщепленного на С конце эктодомена белка F RSV изменена для предотвращения расщепления в участке расщепления фурином приблизительно в положении 136/137, но содержит встречающийся в природе участок расщепления фурином приблизительно в положении 109/110.

Специалист в данной области может легко разработать и представить себе множество конкретных аминокислотных последовательностей, которые обеспечат продукцию и экспрессию клетками-хозяевами не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, включающие аминокислотные последовательности, которые не расщепляются в участках расщепления фурином приблизительно в положении 136/137. Как правило, независимо заменяют или удаляют одну или более аминокислот, которые являются частью или расположены вблизи участков расщепления фурином приблизительно в положении 136/137. Пригодные аминокислотные замены и делеции, которые предотвращают расщепление приблизительно в положении 136/137, описаны в настоящем документе. Например, можно использовать замену K131Q, делецию аминокислот в положениях 131-134 или замены K131Q/R133Q/R135Q/R136Q, каждая из которых ингибирует расщепление в положении 136/137. В определенных вариантах осуществления не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV содержат, по меньшей мере, одну аминокислотную замену или делецию приблизительно в положениях 133-136.

Аналогично, специалист в данной области может легко разработать и представить себе множество конкретных аминокислотных последовательностей не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV, которые содержат участок расщепления протеазой (например встречающийся в природе или встроенный), который при расщеплении дает первую субъединицу, которая содержит F₁, и вторую субъединицу, которая содержит F₂. Например, аминокислотная последовательность белка F RSV приблизительно от положения 101 до приблизительно положения 161 содержит участки расщепления трипсином, и один или более участков расщепления трипсином могут расщепляться трипсином с образованием субъединиц F₁ и F₂. Если желательно, в не расщепленный на С-конце полипептид эктодомена белка F RSV можно встраивать один или более пригодных участков расщепления протеазой, например, от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161. Встроенные участки распознавания протеазой можно расщеплять с использованием соответствующей протеазы с образованием субъединиц F₁ и F₂. Когда участок распознавания протеазой встраивают в аминокислотную последовательность не расщепленного на С-конце полипептида эктодомена белка F RSV, предпочтительно, чтобы этот участок распознавался протеазой, которая не расщепляет эктодомен встречающегося в природе белка F RSV.

Не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV можно получать с использованием любого пригодного способа. Предпочтительным способом является рекомбинантная экспрессия конструкций, которые кодируют эктодомен белка F RSV, в котором аминокислотная последовательность в участке расщепления фурином приблизительно в положениях 136/137 изменена, так что клеткой-хозяином секретируются не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, которая продуцирует полипептиды в нерасщепленном виде в участке расщепления фурином в положении приблизительно 136/137. Предпочтительно, не расщепленный на С-конце полипептид эктодомена белка F RSV секретируется клеткой-хозяином, которая продуцирует его в качестве субъединицы F₁, которая ассоциирована с

субъединицей F₂, где N-конец субъекдиницы F₁ находится от положения 132 приблизительно до положения 161, но не в положении 137. Не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV можно получать с использованием любой пригодной клетки-хозяина, как описано в настоящем документе.

Один способ согласно этому аспекту изобретения включает: а) предоставление не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный участок расщепления фурином в положении 136/137, и указанные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки, которая продуцирует их в форме фрагмента F₂, который связан с субъекдиницей, которая содержит F₁, но не расщепляется в положении 136/137, и б) расщепление предоставленных не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV протеазой, которая расщепляет эктодомен белка F RSV в участке между положениями 101 и 161, тем самым, получая указанную композицию. В конкретных вариантах осуществления, стадия б) включает расщепление предоставленных не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV протеазой, которая расщепляет эктодомен белка F RSV в участке приблизительно между положениями 101 и 132, или приблизительно между положениями 132 и 161, или приблизительно между положениями 110 и 132. Альтернативно или дополнительно в некоторых вариантах осуществления не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV содержат измененный участок расщепления фурином в положении 136/137, при условии, что измененный участок расщепления фурином не является делецией аминокислот 131-134. В конкретных примерах биологический материал, который содержит не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, включает, по меньшей мере, N-концевой полипептид фурина.

Предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV можно очищать до желаемой степени. Например, предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV могут быть предоставлены в клеточном лизате, гомогенате клеток или кондиционированной клеточной культурой среде, которая по существу не переработана (например, не переработана или только процежена), или в частично или по существу очищенной форме. В конкретных примерах предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV предоставляют в кондиционированной клеточной культурой среде, выбранной из группы, состоящей из кондиционированной клетками насекомых среды, кондиционированной клетками млекопитающих среды, кондиционированной клетками птиц среды, кондиционированной клетками дрожжей среды, кондиционированной клетками *Tetrahymena* среды и их комбинаций.

Обычно предпочтительно, чтобы предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV были очищенными, например, очищенными так, чтобы они были, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенными. Как описано в настоящем документе, не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV можно легко очищать от липидов и липопротеинов, в то время как полученные традиционным способом расщепленные формы белка F RSV очищаются совместно с примесями липидов и липопротеинов. Таким образом, когда предоставляют очищенные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, способ можно использовать для легкого получения композиции, содержащей расщепленные эктодомены белка F RSV,

которые по существу не содержат липидов или липопротеинов.

Пригодные способы расщепления полипептидов с использованием протеазы хорошо известны и повсеместно приняты в данной области. Как правило, полипептиды, подлежащие расщеплению, комбинируют с достаточным количеством протеазы в условиях (например, pH, концентрация полипептида и протеазы, температура), пригодных для расщепления полипептида. Многие пригодные протеазы являются коммерчески доступными, и пригодные условия для проведения расщепления полипептидов хорошо известны для многих протеаз. Если желательно, расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV после расщепления протеазой можно очищать.

В одном примере способа предоставляют не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат неизмененный пептид слияния, такие как не расщепленный на С-конце полипептид эктодомена белка F RSV, в котором ни одна из аминокислот в положениях 137-154 не заменена или не удалена. В другом примере способа предоставляют не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния, такие как не расщепленный на С-конце полипептид эктодомена белка F RSV, в котором приблизительно аминокислоты 137-152, приблизительно аминокислоты 137-153, приблизительно аминокислоты 137-145 или приблизительно аминокислоты 137-142 удалены. Также описаны другие пригодные делеции пептида слияния, такие как делеция аминокислот в положениях 137-146. *Ruiz-Arguello et al., J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004).

В некоторых вариантах осуществления предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV являются очищенными. Предоставленные нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV расщепляют, и расщепление приводит к образованию тримеров расщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV. Если желательно, тримеры можно далее очищать с использованием любых пригодных способов, таких как эксклюзионная хроматография.

В конкретных примерах способа предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV содержат, по меньшей мере, N-концевой полипептид фурина (ФИГ. 1). Предоставленные не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV расщепляют, например трипсином, и расщепление приводит к образованию расщепленных тримеров, розеткообразных структур расщепленных тримеров, или комбинации расщепленных тримеров и розеткообразных структур расщепленных тримеров полипептидов эктодомена белка F RSV. Если желательно, расщепленные тримеры и/или розеткообразные структуры расщепленных тримеров можно далее очищать с использованием любых пригодных способов, таких как эксклюзионная хроматография.

Другой способ этого аспекта изобретения включает: а) предоставление биологического материала, такого как клеточный лизат, гомогенат клеток или кондиционированная клеточной культурой среда, который содержит не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный участок расщепления фурином в положении 136/137, и указанные растворимые полипептиды эктодомена белка F RSV секретируются из клетки, которая продуцирует их в форме фрагмента F₂, который ассоциирован с субъединицей, которая содержит F₁, но является не расщепленной в положении 136/137, при условии, что измененный участок расщепления фурином не является делецией аминокислот 131-134; и б) очистку не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала, тем самым получая композицию. Предпочтительно, N-конец субъединицы F₁ находится от приблизительно положения 110 до приблизительно положения 132.

Более предпочтительно, N-конец субъединицы F₁ находится приблизительно в положении 110. Особенно предпочтительно, чтобы N-конец субъединицы F₁ не представлял собой положение 137. В конкретных примерах биологический материал, который содержит не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, включает, по меньшей мере, N-концевой полипептид фурина.

Если желательно, не расщепленный на C-конце полипептид эктодомена белка F RSV дополнительно содержит измененные или удаленные участки для других протеаз (например, участки расщепления трипсином) от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161 для предотвращения расщепления протеазой (например трипсином). Например, один или более остатков лизина и/или аргинина (например, все остатки лизина и аргинина), присутствующих от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161, удалены или заменены аминокислотой, которая не является лизином или аргинином, и не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV не расщепляются трипсином от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161. Не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV могут содержать неизмененный пептид слияния или измененный пептид слияния, как описано в настоящем документе.

Не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, например, мономеры, тримеры и комбинации мономеров и тримеров, можно очищать до желаемой степени. Как правило, предпочтительно, чтобы мономеры или тримеры не расщепленного на C-конце полипептида эктодомена белка F RSV были очищенными, например, чтобы они были, по меньшей мере, приблизительно на 75%, по меньшей мере, приблизительно на 80%, по меньшей мере, приблизительно на 85%, по меньшей мере, приблизительно на 90%, по меньшей мере, приблизительно на 95% или по существу гомогенными. Как описано в настоящем документе, не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV можно легко очищать от липидов и липопротеинов, например, эксклюзионной хроматографией. Таким образом, способ можно использовать для легкого получения композиции, содержащей не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, например, мономеры, тримеры или комбинацию мономеров и тримеров, которые по существу свободны от липидов и липопротеинов. В конкретных примерах способа не расщепленные на C-конце полипептиды эктодомена белка F RSV содержат, по меньшей мере, N-концевой полипептид фурина (ФИГ. 1).

В одном примере способ включает предоставление кондиционированной клетками насекомых среды, кондиционированной клетками млекопитающих среды, кондиционированной клетками птиц среды, кондиционированной клетками дрожжей среды, кондиционированной клетками *Tetrahymena* среды или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления тримеры не расщепленных на C-конце полипептидов эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления мономеры не расщепленных на C-конце полипептидов эктодомена белка F RSV очищают. В других вариантах осуществления мономеры и тримеры не расщепленных на C-конце полипептидов эктодомена белка F RSV очищают.

Самореплицирующаяся РНК

Полипептиды RSV-F, описанные в настоящем документе, можно получать экспрессией рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, в клетках индивидуума. Предпочтительными нуклеиновыми кислотами, которые можно вводить индивидууму для обеспечения продукции полипептидов RSV-F, являются самореплицирующиеся молекулы РНК. Самореплицирующиеся молекулы РНК по

изобретению основаны на геномной РНК из РНК-вирусов, но они лишены генов, кодирующих один или более структурных белков. Самореплицирующиеся молекулы РНК могут транслироваться с образованием неструктурных белков вируса РНК и гетерологичных белков, кодируемых самореплицирующейся РНК.

5 Самореплицирующаяся РНК, как правило, содержит, по меньшей мере, один или более генов, выбранных из группы, состоящей из вирусной репликазы, вирусной протеазы, вирусных хеликаз и других неструктурных белков, и также содержит 5'- и 3'-концевые цис-регуляторные последовательности репликации, и если желательно, гетерологичные последовательности, которые кодируют желаемые аминокислотные
10 последовательности (например, белок, антиген). В самореплицирующейся РНК может быть включен субгеномный промотор, который контролирует экспрессию гетерологичной последовательности. Если желательно, гетерологичная последовательность может быть слита в рамке считывания с другими кодирующими областями в самореплицирующейся РНК, и/или она может находиться под контролем
15 участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

Самореплицирующиеся молекулы РНК по изобретению можно конструировать так, чтобы самореплицирующаяся молекула РНК не могла индуцировать продукцию инфекционных вирусных частиц. Этого можно достигать, например, удалением одного или более вирусных генов, кодирующих структурные белки, которые необходимы для
20 образования вирусных частиц, из самореплицирующихся РНК. Например, когда самореплицирующаяся молекула РНК основана на альфа-вирусе, таком как вирус Sinebis (SIN), вирус леса Семлики, вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), может быть удален один или более генов, кодирующих структурные белки вирусы, такие как гликопротеины капсида и/или оболочки. Если желательно,
25 самореплицирующиеся молекулы РНК по изобретению можно конструировать для индукции продукции инфекционных вирусных частиц, которые ослаблены или вирулентны, или для продукции вирусных частиц, которые способны к одному раунду последующего инфицирования.

Самореплицирующиеся молекула РНК может, когда ее доставляют в клетку
30 позвоночных даже без каких-либо белков, приводить к продукции множества дочерних РНК путем транскрипции с нее самой (или с ее антисмысловой копии). Самореплицирующаяся РНК может прямо транслироваться после доставки в клетку, и эта трансляция обеспечивает РНК-зависимую РНК полимеразу, которая затем продуцирует транскрипты с доставленной РНК. Таким образом, доставленная РНК
35 приводит к продукции множества дочерних РНК. Эти транскрипты являются антисмысловыми относительно доставляемой РНК и могут транслироваться сами по себе с получением экспрессии *in situ* продукта гена, или могут транскрибироваться с получением дополнительных транскриптов с той же смысловой цепью, что и у доставляемой РНК, которые транслируются для обеспечения экспрессии *in situ*
40 кодируемого полипептида RSV-F.

Одной пригодной системой для обеспечения саморепликации является применение репликона на основе РНК альфавируса. Эти +цепочечные репликоны транслируются после доставки в клетку с образованием репликазы (или репликазы-транскриптазы). Репликаза транслируется в качестве полибелка, который подвергается ауторасщеплению
45 с образованием комплекса репликации, который создает копии в виде геномных цепей доставленной РНК с + цепью. Эти -цепочечные транскрипты могут сами по себе транслироваться с образованием дополнительных копий +цепочечной исходной РНК, а также они могут образовывать субгеномный транскрипт, который кодирует

полипептид RSV-F. Таким образом, трансляция субгеномного транскрипта приводит к экспрессии полипептида RSV-F *in situ* инфицированной клеткой. В пригодных репликациях альфавируса может использоваться репликаза из вируса sindbis, вируса леса Семлики, вируса восточного энцефалита лошадей, вируса венесуэльского энцефалита лошадей, и т.д.

Таким образом, предпочтительная самореплицирующаяся молекула РНК кодирует (i) РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая может транскрибировать РНК с самореплицирующейся молекулы РНК и (ii) полипептид RSV-F. Полимераза может представлять собой репликазу альфавируса, например, содержащую белок nsP4 альфавируса.

В то время как природные геномы альфавируса кодируют структурные белки вириона в дополнение к неструктурному полибелку репликазы, предпочтительно, чтобы самореплицирующаяся молекула РНК по изобретению на основе альфавируса не кодировала структурные белки альфавируса. Таким образом, самореплицирующаяся РНК может приводить к продукции геномных РНК-копий ее самой в клетке, но не к продукции РНК-содержащих вирионов альфавируса. Неспособность продуцировать эти вирионы означает, что, в отличие от альфавируса дикого типа, самореплицирующаяся молекула РНК не может постоянно поддерживаться в инфекционной форме. Структурные белки альфавируса, которые необходимы для постоянного поддержания вирусов дикого типа, отсутствуют в самореплицирующихся РНК по изобретению и их место занято геном(ами), кодирующим требуемый продукт гена, так что субгеномный транскрипт кодирует желаемый продукт гена, а не структурные белки вириона альфавируса.

Таким образом, самореплицирующаяся молекула РНК, пригодная для изобретения, может иметь две открытые рамки считывания. Первая (5') открытая рамка считывания кодирует репликазу; вторая (3') открытая рамка считывания кодирует полипептид RSV-F. В некоторых вариантах осуществления РНК может иметь дополнительные (нижележащие) открытые рамки считывания, например, которые кодируют другие желаемые продукты генов. Самореплицирующаяся молекула РНК может иметь 5'-последовательность, которая совместима с кодируемой репликазой.

В одном аспекте самореплицирующаяся молекула РНК происходит из альфавируса или основана на нем. В других аспектах самореплицирующаяся молекула РНК происходит из или основана на вирусе, отличном от альфавируса, предпочтительно, на РНК-вирусах с положительной цепью, и более предпочтительно на пикорнавирусе, флавивирусе, рубивирусе, пестивирусе, гепацивирусе, клицивирусе или коронавирусе. Пригодные последовательности альфавируса дикого типа хорошо известны и доступны из депозитариев, таких как American Type Culture Collection, Rockville, Md. Типичные примеры пригодных альфавирусов включают Aura (ATCC VR-368), вирус Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), вирус Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), вирус восточного энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), вирус Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), вирус Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), вирус Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), вирус Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), вирус реки Росс (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), вирус леса Семлики (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), вирус Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), вирус западного энцефаломиелита лошадей (ATCC VR-

70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), и Y-62-33 (ATCC VR-375).

Самореплицирующаяся РНК может быть связана с системой для доставки. Самореплицирующуюся РНК можно вводить с адъювантом или без него.

СИСТЕМЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ РНК

Самореплицирующиеся РНК по изобретению пригодны для доставки различными способами, такими как доставка простой РНК или в комбинации с липидами, полимерами или другими соединениями, которые способствуют проникновению в клетки. Самореплицирующиеся молекулы РНК по настоящему изобретению можно вводить в клетки-мишени или индивидуумам с использованием любого пригодного способа, например, путем прямой инъекции, микроинъекции, электропорации, липофекции, биолистическими способами и т.п. Самореплицирующуюся молекулу РНК также можно вводить в клетки рецептор-опосредуемым эндоцитозом. См. например, патент США № 6090619; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 263:14621 (1988); и Curiel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850 (1991). Например, в патенте США № 6083741 описано введение экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих путем связывания нуклеиновой кислоты с поликатионной частью (например поли-L-лизин, имеющий 3-100 остатков лизина), которая сама по себе связана со связывающей рецептор интегрин

частью (например, циклический пептид, имеющий последовательность Arg-Gly-Asp). Самореплицирующуюся молекулу РНК по настоящему изобретению можно доставлять в клетки с помощью амфифильных веществ. См. например, патент США № 6071890. Как правило, молекула нуклеиновой кислоты может образовывать комплекс с катионным амфифильным веществом. Клетки млекопитающих, контактирующие с комплексом, могут легко его захватывать.

Самореплицирующуюся РНК можно доставлять в качестве простой РНК (например только в качестве водного раствора РНК) но, для усиления проникновения в клетки, а также для последующих внутриклеточных эффектов, самореплицирующуюся РНК предпочтительно вводят в комбинации с системой для доставки, такой как система для доставки в виде частиц или эмульсии. Специалистам в данной области известно большое количество систем для доставки. Такие системы для доставки включают, например, доставку на основе липосом (Debs and Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino and Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose, патент США № 5279833; Brigham (1991), WO 91/06309; и Felgner *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414), а также применение вирусных векторов (например аденовирусных (см., например, Berns *et al.* (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 95-104; Ali *et al.* (1994) Gene Ther. 1: 367-384; и Haddada *et al.* (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pt 3): 297-306 для обзора), папилломавирусных, ретровирусных (см., например, Buchscher *et al.* (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann *et al.* (1992) J. Virol. 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, (1990) Virol. 176:58-59; Wilson *et al.* (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller *et al.*, J. Virol. 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal *et al.*, PCT/US94/05700, и Rosenberg and Fauci (1993), Fundamental Immunology, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York и ссылки в ней, и Yu *et al.*, Gene Therapy (1994) выше) и аденоассоциированных вирусных векторов (см., West *et al.* (1987) Virology 160:38-47; Carter *et al.* (1989), патент США № 4797368; Carter *et al.* WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94:1351 и Samulski (выше) для обзора AAV-векторов; также см. Lebkowski, патент США № 5173414; Tratschin *et al.* (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin, *et al.* (1984) Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466-6470; McLaughlin *et al.* (1988) и Samulski *et al.* (1989) J. Virol., 63:03822-3828) и т.п.

Три особенно пригодных системы для доставки представляют собой (i) липосомы (ii) нетоксичные и биodeградируемые полимерные микрочастицы (iii) катионные субмикронные эмульсии типа "масло-в-воде".

Липосомы

5 Различные амфифильные липиды могут формировать бислои в водной среде, инкапсулируя РНК-содержащее водное ядро, в виде липосомы. Эти липиды могут иметь анионную, катионную или цвиттерионную гидрофильную концевую группу. Начало формирования липосом из анионных фосфолипидов датируется 1960-ыми годами, а катионные образующие липосомы липиды исследуют с 1990-ых годов. Некоторые
10 фосфолипиды являются анионными, в то время как другие являются цвиттерионными. Пригодные классы фосфолипидов включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилхолины, фосфатидилсерины и фосфатидилглицерины и некоторые пригодные фосфолипиды приведены в таблице 20. Пригодные катионные липиды включают, но не ограничиваются ими,
15 диолеилтриметиламмонийпропан (DOTAP), 1,2-дистеарилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DSDMA), 1,2-диолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DlinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DLenDMA). Цвиттерионные липиды включают, но не ограничиваются ими, ацильные цвиттерионные липиды и простые эфирные
20 цвиттерионные липиды. Примерами пригодных цвиттерионных липидов являются DPPC, DOPC и додецилфосфохолин. Липиды могут быть насыщенными или ненасыщенными.

Липосомы могут быть образованы из одного липида или из смеси липидов. Смесь может содержать (i) смесь анионных липидов (ii) смесь катионных липидов (iii) смесь
25 цвиттерионных липидов (iv) смесь анионных липидов и катионных липидов (v) смесь анионных липидов и цвиттерионных липидов (vi) смесь цвиттерионных липидов и катионных липидов или (vii) смесь анионных липидов, катионных липидов и цвиттерионных липидов. Аналогично, смесь может содержать как насыщенные, так и ненасыщенные липиды. Например, смесь может содержать DSPC (цвиттерионный
30 насыщенный), DlinDMA (катионный ненасыщенный) и/или DMPG (анионный насыщенный). Когда используют смесь липидов, не все липидные компоненты в смеси должны быть амфифильными, один или более амфифильных липидов можно смешивать с холестерином.

Гидрофильную часть липида можно пегилировать (т.е. модифицировать ковалентном
35 присоединением полиэтиленгликоля). Эта модификация может увеличивать стабильность и предотвращать неспецифическую адсорбцию липосом. Например, липиды могут быть конъюгированы с PEG с использованием способов, таких как способы, описанные в Heyes et al. (2005) J Controlled Release 107:276-287.

Смесь DSPC, DlinDMA, PEG-DMPG и холестерина использована в примерах.
40 Отдельный аспект изобретения представляет собой липосому, содержащую DSPC, DlinDMA, PEG-DMG и холестерин. В этой липосоме предпочтительно инкапсулирована РНК, такая как самореплицирующаяся РНК, например, кодирующая иммуноген.

Липосомы обычно подразделяют на три группы: многослойные везикулы (MLV); небольшие однослойные везикулы (SUV) и крупные однослойные везикулы (LUV).
45 MLV имеют множество бислоев в каждой везикуле, образующих несколько отдельных водных компартментов. SUV и LUV имеют единичный бислой, в котором инкапсулирована водная сердцевина; SUV, как правило, имеют диаметр ≤ 50 нм и LUV имеют диаметр > 50 нм. Липосомы, пригодные для изобретения, в идеальном случае

представляют собой LUV с диаметром в диапазоне 50-220 нм. Для композиции, содержащей совокупность LUV с различными диаметрами: (i), по меньшей мере, 80% по количеству должны иметь диаметры в диапазоне 20-220 нм, (ii) средний диаметр (Zav, по интенсивности) совокупности в идеальном случае находится в диапазоне 40-200 нм, и/или (iii) диаметры должны иметь индекс полидисперсности $<0,2$.

Способы получения пригодных липосом хорошо известны в данной области например см. *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols*. (ed. Weissig). Humana Press, 2009. ISBN 160327359X; *Liposome Technology, volumes I, II & III*. (ed. Gregoriadis). Informa Healthcare, 2006; и *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes)*. (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002. Один из пригодных способов вовлекает смешение (i) раствора липидов в этаноле (ii) водного раствора нуклеиновой кислоты и (iii) буфера, с последующим перемешиванием, уравниванием, разбавлением и очисткой (Heyes et al. (2005) *J Controlled Release* 107:276-87).

РНК предпочтительно инкапсулируют в липосомы, и, таким образом, липосома формирует внешний слой вокруг водной содержащей РНК-сердцевин. Было выявлено, что это инкапсулирование защищает РНК от расщепления РНКазой. Липосомы могут включать некоторую внешнюю РНК (например на поверхности липосом), но, по меньшей мере, половина РНК (и в идеальном случае вся РНК) является инкапсулированной.

Полимерные микрочастицы

Различные полимеры могут образовывать микрочастицы для инкапсулирования или адсорбции РНК. Применение по существу нетоксичного полимера означает, что реципиент может получать частицы безопасно, и применение биodeградируемого полимера означает, что частицы могут метаболизироваться после доставки, избегая длительного существования. Пригодные полимеры также являются стерилизуемыми, чтобы облегчать получение составов фармацевтической категории.

Пригодные нетоксичные и биodeградируемые полимеры включают, но не ограничиваются ими, поли(α -гидроксикислоты), полигидроксимасляные кислоты, полилактоны (включая поликапролактоны), полидиоксаноны, поливалеролактон, простые полиортоэфиры, полиангидриды, полицианоакрилаты, происходящие из тирозина поликарбонаты, поливинилпирролидиноны или полиэфирамида и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления микрочастицы сформированы из поли(α -гидроксикислот), таких как поли(лактиды) ("PLA"), сополимеры лактида и гликолида, такие как сополимер D,L-лактида и гликолида ("PLG"), и сополимеры D,L-лактида и капролактона. Пригодные PLG полимеры включают полимеры, имеющие молярное отношение лактид/гликолид в диапазоне, например, от 20:80 до 80:20 например 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25. Пригодные полимеры PLG включают полимеры, имеющие молекулярную массу, например 5000-200000 Да, например 10000-100000, 20000-70000, 40000-50000 Да.

Микрочастицы в идеальном случае имеют диаметр в диапазоне от 0,02 мкм до 8 мкм. Для композиции, содержащей совокупность микрочастиц с различными диаметрами, по меньшей мере, 80% по количеству должны иметь диаметры в диапазоне 0,03-7 мкм.

Способы получения пригодных микрочастиц хорошо известны в данной области, например см. *Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes)*. (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002; *Polymers in Drug Delivery*. (eds. Uchegbu & Schatzlein). CRC Press, 2006. (в частности, глава 7) и

Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996. Для способствования абсорбции РНК, микрочастица может включать катионное поверхностно-активное вещество и/или липид, например, как описано в O'Hagan et al. (2001) J Virology 75:9037-9043; и Singh et al. (2003) Pharmaceutical Research 20: 247-251. Альтернативным способом получения полимерных микрочастиц является формование и отверждение, например, как описано в WO2009/132206.

Микрочастицы по изобретению могут иметь зета-потенциал 40-100 мВ.

РНК можно адсорбировать на микрочастицы, и адсорбции может способствовать включение катионных материалов (например катионных липидов) в микрочастицу.

Катионные эмульсии типа "масло-в-воде"

Эмульсии типа "масло-в-воде" известны в качестве адъювантов вакцин против вируса гриппа, например адъювант MF59TM в продукте FLUADTM, и адъювант AS03 в продукте PREPANDRIXTM. В доставке РНК в соответствии с настоящим изобретением может использоваться вода типа "масло-в-воде", при условии, что эмульсия включает одну или более катионных молекул. Например, катионный липид может быть включен в эмульсию с образованием положительно заряженной каплевидной поверхности, с которой может связываться отрицательно заряженная РНК.

Эмульсия содержит одно или более масел. Пригодное масло(а) включает масла, например из животного (такого как рыба) или растительного источника. Масло в идеальном случае является биodeградируемым (метаболизируемым) и биосовместимым. Источники растительных масел включают орехи, семена и зерна. Примерами ореховых масел являются наиболее широкодоступные арахисовое масло, соевое масло, кокосовое масло и оливковое масло. Можно использовать масло хохобы, например, полученное из бобов хохобы. Масло семян включают сафлоровое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло и т.п. В зерновой группе, кукурузное масло является наиболее широкодоступным, однако также можно использовать масло других зерен хлебных злаков, таких как пшеница, овес, рожь, рис, метличка абиссинская, тритикале и т.п. Сложные эфиры жирных кислот с 6-10 атомами углерода и глицерина и 1,2-пропандиола, хотя и не встречаются в природе в маслах семян, можно получать гидролизом, разделением и этерификацией соответствующих материалов, начиная с масла орехов и семян. Жиры и масла из молока млекопитающих являются метаболизируемыми и, таким образом, их можно использовать. Способы разделения, очистки, сапонификации и другие способы, необходимые для получения чистых масел из животных источников, хорошо известны в данной области.

Большинство рыб содержат метаболизируемые масла, которые можно легко выделять. Например, жир печени трески, жир печени акулы и китовый жир, такой как спермацет, являются примерами нескольких рыбьих жиров, которые можно использовать для настоящего изобретения. Количество масел с разветвленной цепью синтезируют биохимически в изопреновых частях молекул из 5 атомов углерода, и их, как правило, называют терпеноидами. Сквалан, насыщенный аналог сквалена, также является предпочтительным маслом. Рыбьи жиры, включая сквален и сквалан, являются широкодоступными из коммерческих источников или их можно получать способами, известными в данной области.

Другими предпочтительными маслами являются токоферолы, в частности, в комбинации со скваленом. Когда композиция включает токоферол, можно использовать любой из α -, β -, γ -, δ -, ϵ - или ξ -токоферолов, однако предпочтительными являются α -токоферолы. Можно использовать как D- α -токоферол, так и DL- α -токоферол. Предпочтительным α -токоферолом является DL- α -токоферол. Можно использовать

комбинацию масел, содержащую сквален и токоферол (например, DL- α -токоферол).

Предпочтительные эмульсии содержат сквален, жир печени акулы, который является разветвленным ненасыщенным терпеноидом ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C(=CHCH_2CH_2C(CH_3)_2=CHCH_2-)]_2$; 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексан; CAS RN 7683-64-9).

Эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать комбинацию масел, например, сквалена и, по меньшей мере, одного другого масла.

Водный компонент эмульсии может представлять собой простую воду (например w.f.i.) или он может включать другие компоненты, например растворенные в нем вещества. Например, он может включать соли, обеспечивающие буфер, например цитратные или фосфатные соли, такие как натриевые соли. Типичные буферы включают: фосфатный буфер; Tris-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер; или цитратный буфер. Забуференная водная фаза является предпочтительной, и буферы, как правило, включают в диапазоне 5-20 мМ.

Эмульсия также включает катионный липид. Предпочтительно этот липид представляет собой поверхностно-активное вещество, так что он может способствовать образованию и стабилизации эмульсии. Пригодные катионные липиды, как правило, содержат атом азота, который является положительно заряженным в физиологических условиях, например, в качестве третичного или четвертичного амина. Этот азот может быть в гидрофильной концевой группе амфифильного поверхностно-активного вещества. Пригодные катионные липиды включают, но не ограничиваются ими: 1,2-диолеилокси-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), 3'-[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерин (DC-холестерин), диметилдиооктадециламмоний (DDA, например бромид), 1,2-димиристоил-3-триметиламмонийпропан (DMTAP), дипальмитоил(C16:0)триметиламмонийпропан (DPTAP), дистеароилтриметиламмонийпропан (DSTAP). Другие пригодные катионные липиды представляют собой: хлорид бензалкония (BAK), хлорид бензэтония, цетрамид (который содержит бромид тетрадецилтриметиламмония и, возможно, небольшие количества бромида дедецилтриметиламмония и бромида гексадецилтриметиламмония), хлорид цетилпиридиния (CPC), хлорид цетилтриметиламмония (CTAC), N,N',N'-полиоксиэтилен (10)-N-таллов-1,3-диаминопропан, бромид додецилтриметиламмония, бромид гексадецилтриметиламмония, смешанный бромид алкилтриметиламмония, хлорид бензилдиметилдодециламмония, хлорид бензилдиметилгексадециламмония, метоксид бензилтриметиламмония, бромид цетилдиметилэтиламмония, бромид диметилдиооктадециламмония (DDAB), хлорид метилбензэтония, хлорид декаметония, смешанный хлорид метилтриалкиламмония, хлорид метилтриоктиламмония), хлорид N,N-диметил-N-[2(2-метил-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси)этоксиэтил]бензолметанаминия (DEBDA), соли диалкилдиметиламмония, хлорид [1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония, 1,2-диацил-3-(триметиламмоний)пропан (ацильная группа = димиристоил, дипальмитоил, дистеароил, диолеил), 1,2-диацил-3-(диметиламмоний)пропан (ацильная группа=димиристоил, дипальмитоил, дистеароил, диолеил), холиновый эфир 1,2-диолеоил-3-(4'-триметиламмоний)бутаноил-sn-глицерина, 1,2-диолеоил-3-сукцинил-sn-глицерин, холестерил-(4'-триметиламмоний)бутаноат), соли N-алкилпиридиния (например бромид цетилпиридиния и хлорид цетилпиридиния), соли N-алкилпиперидиния, дикатионные электролиты с двумя ионизированными группами, разделенными гибкой цепью ($C_{12}Me_6$; $C_{12}BU_6$), диалкилглицетилфосфорилхолин, лизолецитин, L- α -диолеилфосфатидилэтаноламин, холиновый эфир гемисукцината холестерина, липополиамины, включая, но не ограничиваясь ими,

диоктадециламидоглицилспермин (DOGS),
 дипальмитоилфосфатидилэтаноламидоспермин (DPPES), липополи-L- (или D)- лизин
 (LPLL, LPDL), поли (L (или D)-лизин, конъюгированный с N-
 глутарилфосфатидилэтаноламином, сложный эфир дидодецилглутамата с боковой
 5 аминогруппой (C[^]GluPhCnN), сложный эфир дитетрадецилглутамата с боковой
 аминогруппой (Cl4GluCnN+), катионные производные холестерина, включая, но не
 ограничиваясь ими соль холестерил-3 β -оксисукцинамидоэтиленцентриметиламмония,
 холестерил-3 β -оксисукцинамидоэтилен-диметиламин, соль холестерил-3 β -
 карбоксиамидоэтиленцентриметиламмония и холестерил-3 β -
 10 карбоксиамидоэтилендиметиламин. Другие пригодные катионные липиды описаны в
 US 2008/0085870 и US 2008/0057080, которые включены в настоящий документ в качестве
 ссылок.

Катионный липид предпочтительно является биodeградируемым (метаболизруемым)
 и биосовместимым.

15 В дополнение к маслам и катионным липидам, эмульсия может включать неионное
 поверхностно-активное вещество и/или цвиттерионное поверхностно-активное вещество.
 Такие поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими:
 поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтилена и
 сорбитана (обычно обозначаемые как Tween), особенно полисорбат 20 и полисорбат
 20 80; сополимеры окиси этилена (EO), окиси пропилена (PO) и/или окиси бутилена (BO),
 продаваемые под торговым названием DOWFAXTM, такие как линейные блок-
 сополимеры EO/PO; октоксиполы, которые могут варьировать по числу повторяющихся
 этокси(окси-1,2-этандинильных)групп, причем конкретный интерес представляют
 октоксипол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)
 25 полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин
 (лецитин); жирные простые эфиры полиоксиэтилена и лаурилового, цетилового,
 стеарилового и олеилового спиртов (известных как поверхностно-активные вещества
 Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные эфиры
 сорбитана (обычно известные как Span), такие как триолеат сорбитана (Span 85) и
 30 монолаурат сорбитана. Предпочтительными поверхностно-активными веществами
 для включения в эмульсию являются полисорбат 80 (Tween 80, моноолеат
 полиоксиэтилена сорбитана), Span 85 (триолеат сорбитана), лецитин и Triton X-100.

Можно использовать смеси поверхностно-активных веществ, например, смеси Tween
 80/Span 85. Также пригодна комбинация сложного эфира полиоксиэтилена и сорбитана,
 35 такого как моноолеат полиоксиэтилена сорбитана (Tween 80), и октоксипола, такого
 как трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол (Triton X-100). Другое пригодное сочетание
 включает лаурет-9 вместе со сложным эфиром полиоксиэтилена сорбитана и/или
 октоксиполом. Пригодные смеси могут содержать поверхностно-активное вещество с
 величиной HLB в диапазоне 10-20 (например полисорбат 80, с HLB 15,0) и поверхностно-
 40 активное вещество с величиной HLB в диапазоне 1-10 (например сорбитана триолеат,
 с HLB 1,8).

Предпочтительные количества масла (% по объему) в конечной эмульсии составляют
 2-20% например 5-15%, 6-14%, 7-13%, 8-12%. Особенно пригодным является содержание
 сквалена приблизительно 4-6% или приблизительно 9-11%.

45 Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (% по массе) в
 конечной эмульсии составляют от 0,001% до 8%. Например: сложные эфиры
 полиоксиэтилена и сорбитана (такие как полисорбат 80): от 0,2 до 4%, в частности 0,4-
 0,6%, 0,45-0,55%, приблизительно 0,5% или 1,5-2%, 1,8-2,2%, 1,9-2,1%, 2%, или 0,85-0,95%,

или приблизительно 1%; сложные эфиры сорбитана (такие как триолеат сорбитана): от 0,02 до 2%, в частности приблизительно 0,5% или приблизительно 1%; октил- или нонилфеноксиполиоксиэтаноли (такие как Triton X-100) от 0,001 до 0,1%, в частности от 0,005 до 0,02%; простые эфиры полиоксиэтилена (такие как лаурет 9): от 0,1 до 8%,
 5 предпочтительно от 0,1 до 10% и, в частности, от 0,1 до 1% или приблизительно 0,5%.

Абсолютные количества масла и поверхностно-активного вещества и их соотношение могут варьировать в широких пределах, тем не менее, образуя эмульсию. Специалист в данной области может легко варьировать относительные соотношения компонентов для получения желаемой эмульсии, однако типичным является соотношение масс от
 10 4:1 до 5:1 для масла и поверхностно-активного вещества (избыток масла).

Важным параметром обеспечения иммуностимулирующей активности эмульсии, в частности у крупных животных, является размер капель масла (диаметр). Наиболее эффективные эмульсии имеют размер капель в субмикронном диапазоне. Пригодными являются размеры капель в диапазоне 50-750 нм. Наиболее пригодный средний размер
 15 капель составляет менее 250 нм, например, менее 200 нм, менее 150 нм. Пригодным является средний размер капель в диапазоне 80-180 нм. Идеально, по меньшей мере, 80% (по количеству) капель масла эмульсии имеют диаметр менее 250 нм, и предпочтительно, по меньшей мере, 90%. Устройства для определения среднего размера капель в эмульсии и распределения размеров, являются коммерчески доступными. В
 20 них, как правило, используются технологии динамического рассеяния света и/или оптического считывания одиночных частиц, например серии устройств AccusizerTM и NicompTM, доступных от Particle Sizing Systems (Santa Barbara, США), или устройства ZetasizerTM от Malvern Instruments (Великобритания), или устройства Particle Size
 25 Distribution Analyzer от Horiba (Kyoto, Япония).

В идеальном случае, распределение размеров капель (по количеству) имеет только один максимум т.е. существует одна совокупность капель, распределенных вблизи среднего значения (моды), вместо наличия двух максимумов. Предпочтительные эмульсии имеют полидисперсность <0,4, например 0,3, 0,2 или менее.

Пригодные эмульсии с субмикронными каплями и узким распределением размеров можно получать с использованием микрофлуидизации. Этот способ снижает средний размер капель масла посредством движущихся потоков входящих компонентов через
 30 геометрически фиксированные каналы при высоком давлении и высокой скорости. Эти потоки контактируют со стенками каналов, стенами камеры и друг с другом.

Полученные силы сдвига, удара и кавитации вызывают уменьшение размера капель. Можно проводить повторяющиеся стадии до тех пор, пока не достигнут эмульсии с
 35 желаемым средним значением и распределением размера капель.

В качестве альтернативы микрофлуидизации можно использовать термические способы для обеспечения инверсии фаз. Эти способы также могут обеспечить
 40 субмикронную эмульсию с узким распределением размеров частиц.

Предпочтительные эмульсии можно стерилизовать фильтрацией т.е. их капли можно пропускать через 220-нм фильтр. Помимо обеспечения стерилизации, эта процедура также удаляет какие-либо крупные капли в эмульсии.

В определенных вариантах осуществления катионный липид в эмульсии представляет собой DOTAP. Катионная эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать от
 45 приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл DOTAP. Например, катионная эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать DOTAP в концентрации от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл, от приблизительно 0,6 мг/мл

мл, приблизительно 0,6 мг/мл, приблизительно 0,62 мг/мл, приблизительно 0,9 мг/мл, приблизительно 1,2 мг/мл, приблизительно 2,46 мг/мл, приблизительно 4,92 мг/мл и т.д. В иллюстративном варианте осуществления катионная эмульсия типа "масло-в-воде" содержит от приблизительно 0,62 мг/мл до приблизительно 4,92 мг/мл DC

5 холестерина, как например, 2,46 мг/мл.

В определенных вариантах осуществления, катионный липид представляет собой DDA. Катионная эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл DDA. Например, катионная эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать DDA в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до

10 приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 4,5 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 4 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3,5 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 3 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 2,5 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 2 мг/мл, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 1,5 мг/мл,

15 от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 1,45 мг/мл, от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,3 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,4 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,6 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,73 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,8

20 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 0,9 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 1,0 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 1,2 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 1,45 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 2,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 3 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл,

25 мл, от приблизительно 3,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 4 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, от приблизительно 4,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 1,2 мг/мл, приблизительно 1,45 мг/мл и т.д. Альтернативно катионная эмульсия типа "масло-в-воде" может содержать DDA в количестве приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 21 мг/мл, приблизительно 21,5 мг/мл,

30 приблизительно 21,6 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл. В иллюстративном варианте осуществления катионная эмульсия типа "масло-в-воде" содержит от приблизительно 0,73 мг/мл до приблизительно 1,45 мг/мл DDA, как например, 1,45 мг/мл.

Для доставки самореплицирующихся молекул РНК, таких как простая РНК или в комбинации с системой для доставки, в соответствии с изобретением в заданные орган

35 или ткань можно использовать катетеры и другие устройства. Пригодные катетеры описаны, например, в патентах США № 4186745; 5397307; 5547472; 5674192 и 6129705, все из которых включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Настоящее изобретение относится к применению пригодных систем для доставки, таких как липосомы, полимерные микрочастицы или микрочастицы субмикронной

40 эмульсии с инкапсулированной или адсорбированной самореплицирующейся РНК, для доставки самореплицирующейся молекулы РНК, которая кодирует полипептид RSV-F, например, для индукции иммунного ответа, отдельно или в комбинации с другой макромолекулой. Изобретение включает липосомы, микрочастицы и субмикронные эмульсии с адсорбированными и/или инкапсулированными самореплицирующимися

45 молекулами РНК, и их комбинации.

Как продемонстрировано далее в разделе "Примеры", самореплицирующиеся молекулы РНК, связанные с липосомами и микрочастицами субмикронной эмульсией, можно эффективно доставлять в клетку хозяина и можно индуцировать иммунный

ответ на белок, кодируемый самореплицирующейся РНК.

Иммуногенная композиция

Изобретение относится к иммуногенным композициям. Иммуногенные композиции могут включать одно активное иммуногенное вещество или несколько иммуногенных веществ. Например, иммуногенная композиция может содержать полипептиды F RSV, которые находятся в единой форме (например мономер, тример или розеткообразные структуры) или в двух или более формах (например смесь мономера и тримера или состояние динамического равновесия между мономером и тримером). Иммуногенная композиция может содержать самореплицирующуюся РНК, кодирующую полипептид RSV-F, и предпочтительно также она содержит пригодную систему для доставки, такую как липосомы, полимерные микрочастицы, эмульсия типа "масло-в-воде" и их комбинации.

Иммуногенные композиции по изобретению также могут содержать одно или более иммунорегуляторных веществ. Предпочтительно, одно или более иммунорегуляторных веществ могут включать один или более адъювантов, например два, три, четыре или более адъювантов. Адъюванты могут включать адъювант TH1 и/или адъювант TH2, дополнительно описанные ниже.

В другом варианте осуществления иммуногенная композиция по изобретению содержит полипептид, который экспонирует эпитоп, присутствующий в конформации "до слияния" или в промежуточной конформации гликопротеина RSV-F, но не экспонирует конформацию "после слияния" этого гликопротеина.

В другом варианте осуществления иммуногенная композиция по изобретению содержит первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит белок F RSV, целиком или частично, и второй полипептид содержит гетерологичный домен олигомеризации. Первый полипептид может содержать эктодомен белка F RSV. Второй полипептид может представлять собой домен тримеризации из гемагглютинаина вируса гриппа, домена тримеризации из spike вируса SARS, домен тримеризации из gp41 ВИЧ, NadA, модифицированного GCN4 или ATCase.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, полученные путем предоставления нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV или не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV, и расщепления их с получением субъединиц F₁ и F₂, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей тримеры и/или мономеры нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, полученные предоставлением биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, и очистки мономеров нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, нерасщепленных тримеров или комбинации нерасщепленных мономеров и нерасщепленных тримеров (например смесь или состояние динамического равновесия) из биологического материала, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид эктодомена белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином в положениях приблизительно 106-109 и в положениях приблизительно 133-136, и, если желательно, он дополнительно может содержать измененный пептид слияния. В других вариантах осуществления эктодомен белка F RSV содержит измененные участки расщепления фурином в положениях приблизительно 106-109 и в положениях приблизительно 133-136, и измененные участки расщепления трипсином от приблизительно положения 101 до приблизительно положения 161, и, если желательно, он может далее содержать

измененный пептид слияния.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей тримеры и/или мономеры не расщепленных на С-конце полипептидов эктодомена белка F RSV, полученные предоставлением биологического материала, который содержит не расщепленные на С-конце полипептиды эктодомена белка F RSV, и очистки мономеров нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV, нерасщепленные тримеры или комбинации нерасщепленных мономеров и нерасщепленных тримеров (например смесь или состояние динамического равновесия) из биологического материала, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, полученные предоставлением биологического материала, который содержит расщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, который содержит измененный пептид слияния (например, по меньшей мере, часть пептида слияния удалена) и очисткой тримеров полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, полученные предоставлением биологического материала, который содержит нерасщепленные полипептиды эктодомена белка F RSV, которые содержат измененный пептид слияния (например, по меньшей мере, часть пептида слияния удалена) и очисткой мономеров нерасщепленных полипептидов эктодомена белка F RSV из биологического материала, как описано в настоящем документе.

Композиции по изобретению предпочтительно пригодны для введения млекопитающему, такому как человек, и включают один или более фармацевтически приемлемый носитель(ей) и/или эксципиент(ов), включая адъюванты. Подробное обсуждение таких компонентов доступно в ссылке 29. Композиции, как правило, находятся в водной форме. Когда композиция представляет собой иммуногенную композицию, она индуцирует иммунный ответ при введении млекопитающему, такому как человек. Иммуногенную композицию можно применять для получения вакцинного состава для иммунизации млекопитающего.

Иммуногенные композиции могут включать одно активное иммуногенное вещество или несколько иммуногенных веществ. Например, полипептид эктодомена белка F RSV можно использовать в одной форме (например, нерасщепленный мономер, расщепленный мономер, нерасщепленный тример, расщепленный тример или розеткообразные структуры расщепленных тримеров) или в двух или более формах (например, смесь нерасщепленного мономера и нерасщепленного тримера или динамическое равновесие между нерасщепленным мономером и нерасщепленным тримером). Дополнительно композиции могут содержать полипептид эктодомена белка F RSV и один или более других белков RSV (например G-белок и/или М-белок) и/или его можно комбинировать с другими иммуногенами из других патогенов.

Композиция может включать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксэтанол. Однако предпочтительно, чтобы вакцина была по существу свободна от (т.е. меньше 5 мкг/мл) ртутисодержащего материала, например, свободна от тиомерсала. Иммуногенные композиции, не содержащие ртути, являются более предпочтительными. Особенно предпочтительными являются не содержащие консервантов иммуногенные композиции.

Для контроля тоничности, предпочтительным является включение физиологической соли, такой как соль натрия. Предпочтительным является хлорид натрия (NaCl), который

может присутствовать в количестве между 1 и 20 мг/мл. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дегидрат фосфата динатрия, хлорид магния, хлорид кальция и т.п.

Композиции, как правило, могут иметь осмоляльность между 200 мосм/кг и 400 мосм/кг, предпочтительно между 240-360 мосм/кг, и более предпочтительно она может находиться в диапазоне 290-310 мосм/кг.

Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер; Tris-буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (в частности, с адъювантом гидроксидом алюминия); или цитратный буфер.

Буферы, как правило, могут быть включены в диапазоне 5-20 мМ. pH композиции, как правило, может составлять от 5,0 до 8,1, и более конкретно от 6,0 до 8,0, например, от 6,5 до 7,5, или от 7,0 до 7,8. Способ в соответствии с изобретением, таким образом, может включать стадию доведения pH нерасфасованной вакцины перед упаковыванием.

Композиция предпочтительно является стерильной. Композиция предпочтительно является непирогенной, например, содержащей <1 EU (единица эндотоксина, стандартный показатель) на дозу, и предпочтительно <0,1 EU на дозу. Композиция предпочтительно не содержит глутена. Вакцины для человека, как правило, вводят в объеме дозировки приблизительно 0,5 мл, хотя детям можно вводить половину дозы (т.е. приблизительно 0,25 мл).

Адъюванты

Композиции по изобретению, которые содержат полипептиды RSV-F или нуклеиновые кислоты, которые кодируют RSV-F, также могут включать один или более адъювантов, например два, три, четыре или более адъювантов, которые могут функционировать, усиливая иммунные ответы (гуморальные и/или клеточные), индуцируемые у пациента, которому вводят композицию. Адъюванты могут включать ТН1-адъювант и/или ТН2-адъювант. Адъюванты, которые можно использовать в композициях по изобретению, включают, но не ограничиваются ими:

- Содержащая минерал композиция. Содержащие минерал композиции, пригодные для применения в изобретении в качестве адъювантов, включают минеральные соли, такие как соли кальция и соли алюминия (или их смеси). Изобретение включает минеральные соли, такие как гидроксиды (например, оксигидроксиды), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты), сульфаты и т.д., или смеси различных минеральных соединений, причем предпочтительными являются соединения, имеющие любую пригодную форму (т.е. гелеобразную, кристаллическую, аморфную и т.д.) и с адсорбцией. Соли кальция включают фосфат кальция (например, частицы "CAP", описанные в ссылке 38). Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты, и т.д. Содержащие минерал композиции также можно изготавливать в качестве частиц соли металла (39). Адъюванты на основе соли алюминия описаны более подробно ниже.

- Композиции на основе масляных эмульсий (см. более подробно ниже). Композиции на основе масляных эмульсий, пригодные для применения в изобретении в качестве адъювантов включают эмульсии типа сквален-вода, такие как MF59 (5% сквален, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span, изготовленные в виде субмикронных частиц с использованием микрофлуидизатора).

- Индуцирующие цитокины средства (более подробно см. ниже). Индуцирующие цитокины средства, пригодные для применения в изобретении, включают агонисты toll-подобного рецептора 7 (TLR7) (например соединения бензоафтиридина, описанные в WO 2009/111337).

- Сапонины (глава 22 ссылки 74), которые представляют собой гетерологичную группу стериновых гликозидов и тритерпеноидных гликозидов, которые встречаются в коре, листьях, стеблях, корнях и даже цветах широкого диапазона видов растений.

Сапонин из коры дерева *Quillaia saponaria Molina* широко исследован в качестве адьюванта. Также сапонин можно коммерчески получать из *Smilax ornata* (sarsapilla), *Gypsophilla paniculata* (фата невесты) и *Saponaria officianalis* (мыльный корень).

Адьювантные составы на основе сапонины включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOM. QS21 поставляется на рынок в качестве StimulonTM. Композиции сапонины очищают с использованием ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. Идентифицированы конкретные фракции, очищенные с использованием этих способов, включая QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. Предпочтительно, сапонин представляет собой QS21. Способ получения QS21 описан в ссылке 40. Также составы на основе сапонинов могут содержать стерин, такой как холестерин (41).

Комбинации сапонинов и холестерин можно использовать для образования уникальных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOM) (глава 23 ссылки 74). ISCOM, как правило, также включают фосфолипид, такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. В ISCOM можно использовать любой известный сапонин. Предпочтительно, ISCOM включает один или более из QuilA, QHA и QHC. ISCOM дополнительно описан в ссылках 41-43. Необязательно, в ISCOM может отсутствовать дополнительный детергент (44). Обзор разработки адьювантов на основе сапонинов может быть найден в ссылках 45 и 46.

- Жировые адьюванты (см. более подробно ниже). Жировые адьюванты (см. более подробно ниже), включая эмульсии типа "масло-в-воде", модифицированный природный липид As, происходящий из липополисахаридов энтеробактерий, соединения фосфолипидов (такие как синтетические димеры фосфолипидов, E6020) и т.п.

- Бактериальные ADP-рибозилирующие токсины (например, термолабильный энтеротоксин *E.coli* "LT", холерный токсин "CT", или коклюшный токсин "PT") и их детоксифицированные производные, такие как мутантные токсины, известные как LT-K63 и LT-R72 (47). Применение детоксифицированных ADP-рибозилирующих токсинов в качестве адьювантов для слизистых оболочек описано в ссылке 48 и в качестве парентеральных адьювантов в ссылке 49.

- Биоадгезивные и мукоадгезивные вещества, такие как микросферы с этерифицированной гиалуроновой кислотой (50) или хитозан и его производные (51).

- Микрочастицы (т.е. частица диаметром от ~100 нм до ~150 мкм, более предпочтительно, диаметром от ~200 нм до ~30 мкм, или диаметром от ~500 нм до ~10 мкм), образованные из материалов, которые являются биологически деградируемыми и нетоксичными (например, поли(α-гидроксикислота), полигидроксимасляная кислота, полимер сложного ортоэфира, полиангидрид, поликапролактон и т.д.), причем предпочтительным является сополимер лактида и гликолида, необязательно обработанный для того, чтобы он имел отрицательно заряженную поверхность (например посредством SDS) или положительно заряженную поверхность (например катионным детергентом, таким как СТАВ).

- Липосомы (главы 13 и 14 ссылки 74). Примеры липосомальных составов, пригодных для применения в качестве адьювантов, описаны в ссылках 52-54.

- Простые эфиры полиоксиэтилена и сложные эфиры полиоксиэтилена (55). Такие составы дополнительно включают поверхностно-активные вещества на основе сложного эфира полиоксиэтилена и сорбитана в сочетании с октоксинолом (56), а также поверхностно-активные вещества на основе алкильных простых эфиров и сложных

эфиров полиоксиэтилена в сочетании, по меньшей мере, с одним дополнительным неионным поверхностно-активным веществом, таким как октоксинал (57).

Предпочтительные простые эфиры полиоксиэтилена выбирают из следующей группы: полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (лаурет 9), полиоксиэтилен-9-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-8-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-4-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-35-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-23-лауриловый эфир.

- Мурамилпептиды, такие как N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин ("thr-MDP"), N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглутамин-L-Ala-

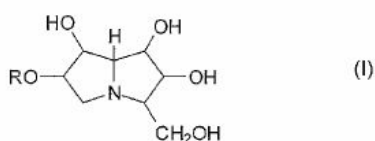
дипальмитоксипропиламид ("DTP-DPP", или "TheramideTM"), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) этиламин ("MTP-PE").

- Препарат протеосом белков наружной мембраны, полученный из первой грамотрицательной бактерии, в сочетании с препаратом липосахарада, полученным из второй грамотрицательной бактерии, где препараты протеосом белков наружной мембраны и липосахарида образуют стабильный нековалентный адъювантный комплекс. Такие комплексы включают "IVX-908", комплекс, состоящий из наружной мембраны и липополисахаридов *Neisseria meningitidis*.

- Полимер полиоксидония (58, 59) или другое N-окисленное производное полиэтиленпиперазина.

- Метилюнозин-5'-монофосфат ("MIMP") (60).

- Полигидроксильрованное соединение пирролизидина 61, такое как соединение формулы:



где R выбран из группы, включающей водород, прямую или разветвленную, незамещенную или замещенную, насыщенную или ненасыщенную ацильную, алкильную (например, циклоалкильную), алкенильную, алкинильную и арильную группы, или их фармацевтически приемлемая соль или производное. Примеры включают, но не ограничиваются ими: казуарин, казуарин-6- α -D-глюкопиранозу, 3-эпиказуарин, 7-эпиказуарин, 3,7-диэпиказуарин и т.д.

- лиганд CD1d, такой как α -гликозилцерамид (62-69) (например, α -галактозилцерамид), фитосфингозин-содержащие α -гликозилцерамиды, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-галактопиранозил)-2-(N-гексакозаноиламино)-1,3,4-октадекантриол], CRONY-101, 3"-O-сульфогалактозилцерамид и т.д.

- гамма-инулин (70) или его производное, такое как алгаммулин.

- Виросомы и вирусоподобные частицы (VLP). Эти структуры, как правило, содержат один или более белков из вируса, необязательно комбинированных или включенных в состав с фосфолипидом. Они, как правило, являются непатогенными, не реплицирующимися и обычно не содержат никакого нативного вирусного генома. Вирусные белки могут быть рекомбинантно полученными или выделенными из целых вирусов. Эти вирусные белки, пригодные для применения в виросомах или VLP, включают белки, происходящие из вируса гриппа (такие как HA или NA), вируса гепатита В (такие как коровые или капсидные белки), вируса гепатита Е, вируса кори, вируса Sindbis, ротавируса, вируса ящура, ретровируса, вируса Норволк, вируса папилломы

человека, ВИЧ, РНК-фагов, Q β -фага (такие как белки оболочки), GA-фага, fr-фага, фага AP205 и Ту (такие как белок p1 ретротранспозона Ту).

Эти и другие адъювантно-активные вещества рассмотрены более подробно в ссылках 74 и 75.

5 Композиции могут включать два, три, четыре или более адъювантов. Например, они могут преимущественно включать как эмульсию типа "масло-в-воде", так и индуцирующее цитокин средство, или как содержащую минерал композицию, так и индуцирующее цитокин средство, или два адъюванта на основе эмульсии типа "масло-в-воде" или два соединения бензонафтиридина и т.д.

10 Антигены и адъюванты в композиции обычно смешаны.

Адъюванты на основе масляных эмульсий

Композиции на основе масляных эмульсий, пригодные для применения в изобретении в качестве адъювантов, включают эмульсии типа сквален-вода, такие как MF59 (5% сквален, 0,5% Tween 80, и 0,5% Span 85, изготовленные в виде субмикронных частиц с использованием микрофлуидизатора). Также можно использовать полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA).

Известны различные эмульсии типа "масло-в-воде", и они, как правило, включают, по меньшей мере, одно масло и, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество, причем масло(а) и поверхностно-активное вещество(а) являются биodeградируемыми (метаболизируемыми) и биосовместимыми. Капли масла в эмульсии, как правило, имеют диаметр менее 5 мкм, и они могут даже иметь субмикронный диаметр, причем этих малых размеров достигают с помощью микрофлуидизатора для получения стабильных эмульсий. Капли с размером менее 220 нм являются предпочтительными, поскольку их можно подвергать стерилизации фильтрованием.

25 Изобретение можно использовать с маслами, такими как масла из животного (такого как рыба) или растительного источника. Источники растительных масел включают орехи, семена и зерна. Примерами ореховых масел являются наиболее широко доступные арахисовое масло, соевое масло, кокосовое масло и оливковое масло. Можно использовать масло хохобы, например, полученное из бобов хохобы. Масло семян включает сафлоровое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло и т.п. В зерновой группе, кукурузное масло является наиболее широко доступным, однако также можно использовать масло других зерен хлебных злаков, таких как пшеница, овес, рожь, рис, метличка абиссинская, тритикале и т.п. Сложные эфиры жирных кислот с 6-10 атомами углерода и глицерина и 1,2-пропандиола, хотя и не встречаются в природе в маслах семян, можно получать гидролизом, разделением и этерификацией соответствующих материалов, начиная с масла орехов и семян. Жиры и масла из молока млекопитающих являются метаболизируемыми и, таким образом, их можно использовать для применения на практике этого изобретения. Способы разделения, очистки, сапонификации и другие способы, необходимые для получения чистых масел из животных источников, хорошо известны в данной области.

40 Большинство рыб содержат метаболизируемые масла, которые можно легко выделять. Например, жир печени трески, жир печени акулы и китовый жир, такой как спермацет, являются примерами нескольких рыбьих жиров, которые можно использовать для настоящего изобретения. Количество масел с разветвленной цепью синтезируют биохимически в изопреновых частях молекул из 5 атомов углерода, и их, как правило, обозначают как терпеноиды. Жир печени акулы содержит разветвленные, ненасыщенные терпеноиды, известные как сквален, 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен, которые являются особенно предпочтительными для настоящего

изобретения. Сквалян, насыщенный аналог сквалена, также является предпочтительным маслом. Рыбьи жиры, включая сквален и сквалян, являются широко доступными из коммерческих источников или их можно получать способами, известными в данной области. Другими предпочтительными маслами являются токоферолы (см. ниже).

5 Можно использовать смеси масел.

Поверхностно-активные вещества можно классифицировать по их "HLB" (гидрофильный/липофильный баланс). Предпочтительные поверхностно-активные вещества по изобретению имеют HLB, по меньшей мере, 10, предпочтительно, по меньшей мере, 15 и более предпочтительно, по меньшей мере, 16. Изобретение можно
10 использовать с поверхностно-активными веществами, включающими, но не ограничивающимися ими: поверхностно-активные вещества на основе сложных эфиров полиоксиэтилена и сорбитана (обычно обозначаемые как Tween), особенно полисорбат 20 и полисорбат 80; сополимеры окиси этилена (EO), окиси пропилена (PO) и/или окиси
15 бутилена (BO), продаваемые под торговым названием DOWFAX™, такие как линейные блок-сополимеры EO/PO; октоксинолы, которые могут варьировать по числу повторяющихся этокси(окси-1,2-этандиильных)групп, причем конкретный интерес представляют октоксинол-9 (Triton X-100 или трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол); (октилфенокси)полиэтоксиэтанол (IGEPAL CA-630/NP-40); фосфолипиды, такие как
20 фосфатидилхолин (лецитин); этоксилаты нонилфенола, такие как TERGITOL™ серии NP, жирные простые эфиры полиоксиэтилена из лаурилового, цетилового, стеарилового и олеилового спиртов (известных как поверхностно-активные вещества Brij), такие как монолауриловый эфир триэтиленгликоля (Brij 30); и сложные эфиры сорбитана (обычно известные как SPAN), такие как триолеат сорбитана (Span 85) и монолаурат сорбитана.
25 Предпочтительными поверхностно-активными веществами для включения в эмульсию являются Tween 80™ (моноолеат полиоксиэтилена сорбитана), Span 85 (триолеат сорбитана), лецитин и Triton X-100.

Можно использовать смеси поверхностно-активных веществ, например, смеси Tween 80™/Span 85. Также пригодна комбинация сложного эфира полиоксиэтилена и
30 сорбитана, такого как моноолеат полиоксиэтилена сорбитана (Tween 80™), и октоксинола, такого как трет-октилфеноксиполиэтоксиэтанол (Triton X-100). Другое пригодное сочетание включает лаурет-9 вместе со сложным эфиром полиоксиэтилена сорбитана и/или октоксинолом.

Предпочтительные количества поверхностно-активных веществ (% по массе) представляют собой: сложные эфиры полиоксиэтилена сорбитана (такие как Tween 80™) от 0,01 до 1%, в частности, приблизительно 0,1%; октил- или
35 нонилфеноксиполиоксиэтанола (такие как Triton X-100, или другие детергенты серии Triton) от 0,001 до 0,1%, в частности от 0,005 до 0,02%; простые эфиры полиоксиэтилена
40 (такие как лаурет-9) от 0,1 до 20%, предпочтительно от 0,1 до 10% и, в частности, от 0,1 до 1% или приблизительно 0,5%.

Конкретные адъюванты на основе эмульсии типа "масло-в-воде", пригодные для изобретения, включают, но не ограничиваются ими:

- Субмикронная эмульсия сквалена, TWEEN 80™ и Span 85. Состав эмульсии по
45 объему может представлять собой приблизительно 5% сквален, приблизительно 0,5% полисорбат 80 и приблизительно 0,5% Span 85. В единицах массы, эти отношения составляют 4,3% сквален, 0,5% полисорбат 80 и 0,48% Span 85. Этот адъювант известен в качестве "MF59" (71-73), как более подробно описано в главе 10 ссылки 74 и главе 12

ссылки 75. Эмульсия MF59 преимущественно включает цитратные ионы, например, 10 мМ натрий-цитратный буфер.

- Эмульсия сквалена, токоферола и TWEEN 80TM. Эмульсия может включать фосфатно-солевой буфер. Также она может включать Span 85 (например при 1%) и/или лецитин. Эти эмульсии могут иметь от 2 до 10% сквалена, от 2 до 10% токоферола и от 0,3 до 3% TWEEN 80TM, и массовое отношение сквалена и токоферола предпочтительно составляет <1, поскольку это обеспечивает более стабильную эмульсию. Сквален и TWEEN 80TM могут быть представлены в объемном отношении приблизительно 5:2.

Одну такую эмульсию можно получать растворением TWEEN 80TM в PBS с получением 2% раствора, затем смешиванием 90 мл этого раствора со смесью (5 г DL- α -токоферола и 5 мл сквалена), затем микрофлуидизацией смеси. Полученная эмульсия может иметь субмикронные капли масла, например, со средним диаметром между 100 и 250 нм, предпочтительно приблизительно 180 нм.

- Эмульсия сквалена, токоферола и детергента Triton (например, Triton X-100). Эмульсия также может включать 3d-MPL (см. ниже). Эмульсия может содержать фосфатный буфер.

- Эмульсия, содержащая полисорбат (например, полисорбат 80), детергент Triton (например, Triton X-100) и токоферол (например α -токоферола сукцинат). Эмульсия может включать эти три компонента в массовом отношении приблизительно от 75:1 до 1:10 (например 750 мкг/мл полисорбат 80, 110 мкг/мл Triton X-100 и 100 мкг/мл α -токоферола сукцината), и эти концентрации должны учитывать любой вклад в эти компоненты от антигенов. Эмульсия также может включать сквален. Эмульсия также может включать 3d-MPL (см. ниже). Водная фаза может содержать фосфатный буфер.

- Эмульсия сквалана, полисорбата 80 и полоксамера 401 ("PLURONICTM L121"). Эмульсию можно изготавливать в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. Эта эмульсия является пригодным носителем для доставки мурамилдипептидов, и ее можно использовать с треонил-MDP в адъюванте "SAF-1" (76) (0,05-1% Thr-MDP, 5% сквалан, 2,5% Pluronic L121 и 0,2% полисорбат 80). Ее можно использовать без Thr-MDP, как и в адъюванте "AF" (77) (5% сквалан, 1,25% Pluronic L121 и 0,2% полисорбат 80). Предпочтительной является микрофлуидизация.

- Эмульсия, содержащая сквален, водный растворитель, гидрофильное неионное поверхностно-активное вещество на основе алкилового простого эфира полиоксиэтилена (например, цетостеарилового эфира полиоксиэтилена (12)) и гидрофобное неионное поверхностно-активное вещество (например сложный эфир сорбитана или сложный эфир маннида, такой как моноолеат сорбитана или "Span 80"). Эмульсия предпочтительно является термозависимой и/или она имеет, по меньшей мере, 90% капель масла (по объему) с размером менее 200 нм. Также эмульсия может включать один или более из: алдита; криозащитного вещества (например сахара, такого как додецилмальтозид и/или сахароза); и/или алкилполиглицозида. Такие эмульсии могут быть лиофилизированными.

- Эмульсия, имеющая 0,5-50% масла, 0,1-10% фосфолипида и 0,05-5% неионного поверхностно-активного вещества. Как описано в ссылке 78, предпочтительными фосфолипидными компонентами являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерин, фосфатидная кислота, сфингомиелин и кардиолипин. Капли субмикронных размеров являются преимущественными.

- Субмикронная эмульсия типа "масло-в-воде" неметаболизируемого масла (такого

как легкое минеральное масло) и, по меньшей мере, одного поверхностно-активного вещества (такого как лецитин, TWEEN 80TM или Span 80). Могут быть включены добавки, такие как сапонин QuilA, холестерин, сапонин-липофильный конъюгат (такой как GPI-0100, описанный в ссылке 79, получаемый добавлением алифатического амина к дезацилсапонину через карбоксильную группу глюкуроновой кислоты), бромид диметилдиоктадециламмония и/или N,N-диоктадецил-N,N-бис(2-гидроксиэтил) пропандиамин.

- Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный липофильный этоксилированный жирный спирт, и неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество (например, этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена).

- Эмульсия, содержащая минеральное масло, неионный гидрофильный этоксилированный жирный спирт и неионное липофильное поверхностно-активное вещество (например этоксилированный жирный спирт и/или блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена).

- Эмульсия, в которой сапонин (например, QuilA или QS21) и стерин (например, холестерин) связаны в качестве спиралевидных мицелл (80).

Эмульсии можно смешивать с антигеном непосредственно перед применением, во время доставки. Таким образом, адъювант и антиген можно держать по отдельности в упакованной или распределенной вакцине, готовой для конечного приготовления во время применения. Антиген, как правило, может находиться в водной форме, так чтобы в итоге получить вакцину смешиванием двух жидкостей. Объемное отношение двух жидкостей для смешивания может варьировать (например, между 5:1 и 1:5), однако, как правило, оно составляет приблизительно 1:1.

Индукующие цитокины средства

Индукующие цитокины средства для включения в композиции по изобретению способны, при введении пациенту, вызывать высвобождение иммунной системой цитокинов, включая интерфероны и интерлейкины. Предпочтительные средства могут вызывать высвобождение одного или более из: интерферона- γ ; интерлейкина-1; интерлейкина-2; интерлейкина-12; TNF- α ; TNF- β ; и GM-CSF. Предпочтительные средства вызывают высвобождение цитокинов, ассоциированных с иммунным ответом Th1-типа, например интерферона- γ , TNF- α , интерлейкина-2. Предпочтительным является стимулирование как интерферона- γ , так и интерлейкина-2.

В результате введения композиции по изобретению, таким образом, пациент имеет Т-клетки, которые, при стимуляции антигеном вируса гриппа, могут высвобождать требуемый цитокин(ы) антигенспецифическим образом. Например, Т-клетки, очищенные из его крови, могут высвобождать γ -интерферон при воздействии *in vitro* белка F. Способы измерения таких ответов в моноклеарных клетках периферической крови (PBMC) известны в данной области, и включают ELISA, ELISPOT, проточную цитометрию и ПЦР в режиме реального времени. Например, в ссылке 81 описано исследование, в котором проводили мониторинг антигенспецифического опосредуемого Т-клетками иммунного ответа против столбнячного токсина, конкретно ответа γ -интерферона, и выявили, что ELISPOT представляет собой наиболее чувствительный способ для отличия антигенспецифических ТТ-индуцируемых ответов от спонтанных ответов, но что внутрицитоплазматическая детекция цитокинов проточной цитометрией представляет собой наиболее эффективный способ для детекции эффектов повторной стимуляции.

Пригодные индуцирующие цитокины средства включают, но не ограничиваются

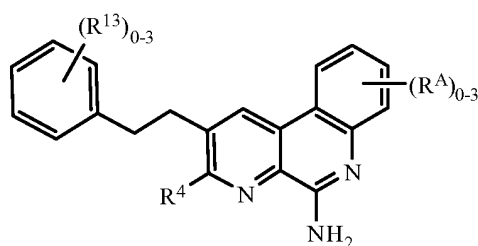
ими:

- Иммуностимулирующий олигонуклеотид, такой как олигонуклеотид, содержащий CpG-мотив (динуклеотидная последовательность, содержащая неметилованный цитозин, связанный фосфатной связью с гуанозином), или двухцепочечную РНК, или олигонуклеотид, содержащий палиндромную последовательность, или олигонуклеотид, содержащий поли(dG)последовательность.

- 3-О-деацилированный монофосфорилипид А ("3dMPL", также известный как "MPLTM") (82-85).

- Соединение имидазохинолина, такое как IMIQUIMODTM ("R-837") (86, 87), RESIQUIMODTM ("R-848") (88), и их аналоги; и их соли (например, соли хлористоводородной кислоты). Дополнительные детали, касающиеся иммуностимулирующих имидазохинолинов, могут быть найдены в ссылках с 89 по 93.

Соединение бензонафтиридина, такое как: (а) соединение формулы:



где:

R^4 выбран из H, галогена, $-C(O)OR^7$, $-C(O)R^7$, $-C(O)N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^{11}R^{12})$, $-N(R^9)_2$, $-NHN(R^9)_2$, $-SR^7$, $-(CH_2)_nOR^7$, $-(CH_2)_nR^7$, $-LR^8$, $-LR^{10}$, $-OLR^8$, $-OLR^{10}$, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила, C_1 - C_6 галоалкила, C_2 - C_8 алкена, C_2 - C_8 алкина, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси, арила, гетероарила, C_3 - C_8 циклоалкила и C_3 - C_8 гетероциклоалкила, где каждая из C_1 - C_6 алкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, C_2 - C_8 алкеновой, C_2 - C_8 алкиновой, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси, арильной, гетероарильной, C_3 - C_8 циклоалкильной и C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^4 необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $-CN$, $-NO_2$, $-R^7$, $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, и $-NR^9S(O)_2R^8$;

каждый L независимо выбран из связи, $-(O(CH_2)_m)_t$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенилена и C_2 - C_6 алкинилена, где каждый из C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенилена и C_2 - C_6 алкинилена L необязательно замещены 1-4 заместителями, независимо выбранными из галогена, $-R^8$, $-OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, и $-OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 выбран из H, C_1 - C_6 алкила, арила, гетероарила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_1 - C_6 гетероалкила, C_1 - C_6 галоалкила, C_2 - C_8 алкена, C_2 - C_8 алкина, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси и C_3 - C_8 гетероциклоалкила, где каждый из C_1 - C_6 алкильной, арильной, гетероарильной, C_3 - C_8 циклоалкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, C_2 - C_8 алкеновой, C_2 - C_8 алкиновой, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси и C_3 - C_8

гетероциклоалкильной групп R^7 необязательно замещена 1-3 группами R^{13} ;

каждый R^8 независимо выбран из H, $-CH(R^{10})_2$, C_1 - C_8 алкила, C_2 - C_8 алкена, C_2 - C_8 алкина, C_1 - C_6 галоалкила, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 гетероалкила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_2 - C_8 гетероциклоалкила, C_1 - C_6 гидроксиалкила и C_1 - C_6 галоалкокси, где каждая из C_1 - C_8 алкильной, C_2 - C_8 алкеновой, C_2 - C_8 алкиновой, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_8 циклоалкильной, C_2 - C_8 гетероциклоалкильной, C_1 - C_6 гидроксиалкильной и C_1 - C_6 галоалкокси групп R^8 необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^9C(O)R^{11}$, $-NR^9R^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-N(R^9)_2$, $-OR^9$, $-OR^{10}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$, и $-OP(O)(OR^{11})_2$;

каждый R^9 независимо выбран из H, $-C(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-C_1$ - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила и C_3 - C_6 циклоалкила, или каждый R^9 независимо представляет собой C_1 - C_6 алкил, который вместе с N, к которому он присоединен, образует C_3 - C_8 гетероциклоалкил, где C_3 - C_8 гетероциклоалкильное кольцо необязательно содержит дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S, и где каждая из C_1 - C_6 алкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_3 - C_6 циклоалкильной, или C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^9 необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$ и $-OP(O)(OR^{11})_2$;

каждый R^{10} независимо выбран из арила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_3 - C_8 гетероциклоалкила и гетероарила, где арильная, C_3 - C_8 циклоалкильная, C_3 - C_8 гетероциклоалкильная и гетероарильная группы необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из галогена, $-R^8$, $-OR^8$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9CO_2R^8$, $-CO_2R^8$, $-C(O)R^8$ и $-C(O)N(R^9)_2$;

R^{11} и R^{12} независимо выбраны из H, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила, C_1 - C_6 галоалкила, арила, гетероарила, C_3 - C_8 циклоалкила и C_3 - C_8 гетероциклоалкила, где каждая из C_1 - C_6 алкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, арильной, гетероарильной, C_3 - C_8 циклоалкильной и C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^{11} и R^{12} необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $-CN$, R^8 , $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-NR^8C(O)R^8$, $-NR^8C(O)OR^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, C_3 - C_8 гетероциклоалкила, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, $-NR^9S(O)_2R^8$, C_1 - C_6 галоалкила и C_1 - C_6 галоалкокси;

или каждый из R^{11} и R^{12} независимо представляет собой C_1 - C_6 алкил и, взятые вместе

с атомом N, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное C₃-C₈гетероциклоалкильное кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S;

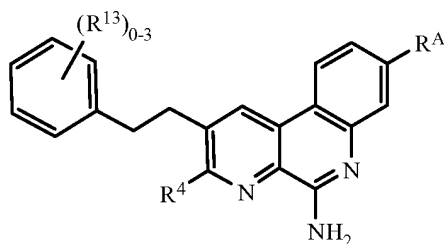
каждый R¹³ независимо выбран из галогена, -CN, -LR⁹, -LOR⁹, -OLR⁹, -LR¹⁰, -LOR¹⁰, -OLR¹⁰, -LR⁸, -LOR⁸, -OLR⁸, -LSR⁸, -LSR¹⁰, -LC(O)R⁸, -OLC(O)R⁸, -LC(O)OR⁸, -LC(O)R¹⁰, -LOC(O)OR⁸, -LC(O)NR⁹R¹¹, -LC(O)NR⁹R⁸, -LN(R⁹)₂, -LNR⁹R⁸, -LNR⁹R¹⁰, -LC(O)N(R⁹)₂, -LS(O)₂R⁸, -LS(O)R⁸, -LC(O)NR⁸OH, -LNR⁹C(O)R⁸, -LNR⁹C(O)OR⁸, -LS(O)₂N(R⁹)₂, -OLS(O)₂N(R⁹)₂, -LNR⁹S(O)₂R⁸, -LC(O)NR⁹LN(R⁹)₂, -LP(O)(OR⁸)₂, -LOP(O)(OR⁸)₂, -LP(O)(OR¹⁰)₂ и -OLP(O)(OR¹⁰)₂;

каждый R^A независимо выбран из -R⁸, -R⁷, -OR⁷, -OR⁸, -R¹⁰, -OR¹⁰, -SR⁸, -NO₂, -CN, -N(R⁹)₂, -NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹C(S)R⁸, -NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹C(S)N(R⁹)₂, -NR⁹CO₂R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)R⁸, -NR⁹NR⁹C(O)N(R⁹)₂, -NR⁹NR⁹CO₂R⁸, -C(O)C(O)R⁸, -C(O)CH₂C(O)R⁸, -CO₂R⁸, -(CH₂)_nCO₂R⁸, -C(O)R⁸, -C(S)R⁸, -C(O)N(R⁹)₂, -C(S)N(R⁹)₂, -OC(O)N(R⁹)₂, -OC(O)R⁸, -C(O)N(OR⁸)R⁸, -C(NOR⁸)R⁸, -S(O)₂R⁸, -S(O)₃R⁸, -SO₂N(R⁹)₂, -S(O)R⁸, -NR⁹SO₂N(R⁹)₂, -NR⁹SO₂R⁸, -P(O)(OR⁸)₂, -OP(O)(OR⁸)₂, -P(O)(OR¹⁰)₂, -OP(O)(OR¹⁰)₂, -N(OR⁸)R⁸, -CH=CHCO₂R⁸, -C(=NH)-N(R⁹)₂, и -(CH₂)_nNHC(O)R⁸; или два соседних заместителя R^A на кольцо A образуют 5-6-членное кольцо, которое содержит вплоть до двух гетероатомов в качестве членов кольца;

n, независимо в каждом случае, равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6, и

t равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; (b) соединение формулы:



где:

R⁴ выбран из H, галогена, -C(O)OR⁷, -C(O)R⁷, -C(O)N(R¹¹R¹²), -N(R¹¹R¹²), -N(R⁹)₂, -NHN(R⁹)₂, -SR⁷, -(CH₂)_nOR⁷, -(CH₂)_nR⁷, -LR⁸, -LR¹⁰, -OLR⁸, -OLR¹⁰, C₁-C₆алкила, C₁-C₆гетероалкила, C₁-C₆галоалкила, C₂-C₈алкена, C₂-C₈алкина, C₁-C₆алкокси, C₁-C₆галоалкокси, арила, гетероарила, C₃-C₈циклоалкил и C₃-C₈гетероциклоалкила, где каждая из C₁-C₆алкильной, C₁-C₆гетероалкильной, C₁-C₆галоалкильной, C₂-C₈алкеновой, C₂-C₈алкиновой, C₁-C₆алкокси, C₁-C₆галоалкокси, арильной, гетероарильной, C₃-C₈циклоалкильной и C₃-C₈гетероциклоалкильной групп R⁴ необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из галогена, -CN, -NO₂, -R⁷, -OR⁸, -C(O)R⁸, -OC

$(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$ и $-NR^9S(O)_2R^8$;

каждый L независимо выбран из связи, $-(O(CH_2)_m)_t$, C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенилена и C_2 - C_6 алкинилена, где каждый из C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенилена и C_2 - C_6 алкинилена L необязательно замещен 1-4 заместителями, независимо выбранными из галогена, $-R^8$, $-OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$ и $-OP(O)(OR^{10})_2$;

R^7 выбран из H, C_1 - C_6 алкила, арила, гетероарила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_1 - C_6 гетероалкила, C_1 - C_6 галоалкила, C_2 - C_8 алкена, C_2 - C_8 алкина, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси и C_3 - C_8 гетероциклоалкила, где каждая из C_1 - C_6 алкильной, арильной, гетероарильной, C_3 - C_8 циклоалкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, C_2 - C_8 алкеновой, C_2 - C_8 алкиновой, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 галоалкокси и C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^7 необязательно замещена 1-3 группами R^{13} ;

каждый R^8 независимо выбран из H, $-CH(R^{10})_2$, C_1 - C_8 алкила, C_2 - C_8 алкена, C_2 - C_8 алкина, C_1 - C_6 галоалкила, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 гетероалкила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_2 - C_8 гетероциклоалкила, C_1 - C_6 гидроксиалкила и C_1 - C_6 галоалкокси, где каждая из C_1 - C_8 алкильной, C_2 - C_8 алкеновой, C_2 - C_8 алкиновой, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, C_1 - C_6 алкокси, C_3 - C_8 циклоалкильной, C_2 - C_8 гетероциклоалкильной, C_1 - C_6 гидроксиалкильной и C_1 - C_6 галоалкокси групп R^8 необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^9C(O)R^{11}$, $-NR^9R^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-N(R^9)_2$, $-OR^9$, $-OR^{10}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$ и $-OP(O)(OR^{11})_2$;

каждый R^9 независимо выбран из H, $-C(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)OR^{10}$, $-S(O)_2R^{10}$, $-C_1$ - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила и C_3 - C_6 циклоалкила, или каждый R^9 независимо представляет собой C_1 - C_6 алкил, который вместе с N, к которому он присоединен, образует C_3 - C_8 гетероциклоалкил, где C_3 - C_8 гетероциклоалкильное кольцо необязательно содержит дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S, и где каждая из C_1 - C_6 алкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_3 - C_6 циклоалкильной или C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^9 необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из $-CN$, R^{11} , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-OC(O)R^{11}$, $-C(O)OR^{11}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}R^{12}$, $-C(O)NR^{11}OH$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$, $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$, $-P(O)(OR^{11})_2$ и $-OP(O)(OR^{11})_2$;

каждый R^{10} независимо выбран из арила, C_3 - C_8 циклоалкила, C_3 - C_8 гетероциклоалкила и гетероарила, где арильная, C_3 - C_8 циклоалкильная, C_3 - C_8 гетероциклоалкильная и гетероарильная группы необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из

галогена, $-R^8$, $-OR^8$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9CO_2R^8$, $-CO_2R^8$, $-C(O)R^8$ и $-C(O)N(R^9)_2$;

R^{11} и R^{12} независимо выбраны из H, C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила, C_1 - C_6 галоалкила, арила, гетероарила, C_3 - C_8 циклоалкила и C_3 - C_8 гетероциклоалкила, где каждая из C_1 - C_6 алкильной, C_1 - C_6 гетероалкильной, C_1 - C_6 галоалкильной, арильной, гетероарильной, C_3 - C_8 циклоалкильной и C_3 - C_8 гетероциклоалкильной групп R^{11} и R^{12} необязательно замещена 1-3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $-CN$, R^8 , $-OR^8$, $-C(O)R^8$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)OR^8$, $-N(R^9)_2$, $-NR^8C(O)R^8$, $-NR^8C(O)OR^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, C_3 - C_8 гетероциклоалкила, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_2N(R^9)_2$, $-NR^9S(O)_2R^8$, C_1 - C_6 галоалкила и C_1 - C_6 галоалкокси;

или каждый из R^{11} и R^{12} независимо представляет собой C_1 - C_6 алкил и, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное C_3 - C_8 гетероциклоалкильное кольцо, необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S;

каждый R^{13} независимо выбран из галогена, $-CN$, $-LR^9$, $-LOR^9$, $-OLR^9$, $-LR^{10}$, $-LOR^{10}$, $-OLR^{10}$, $-LR^8$, $-LOR^8$, $-OLR^8$, $-LSR^8$, $-LSR^{10}$, $-LC(O)R^8$, $-OLC(O)R^8$, $-LC(O)OR^8$, $-LC(O)R^{10}$, $-LOC(O)OR^8$, $-LC(O)NR^9R^{11}$, $-LC(O)NR^9R^8$, $-LN(R^9)_2$, $-LNR^9R^8$, $-LNR^9R^{10}$, $-LC(O)N(R^9)_2$, $-LS(O)_2R^8$, $-LS(O)R^8$, $-LC(O)NR^8OH$, $-LNR^9C(O)R^8$, $-LNR^9C(O)OR^8$, $-LS(O)_2N(R^9)_2$, $-OLS(O)_2N(R^9)_2$, $-LNR^9S(O)_2R^8$, $-LC(O)NR^9LN(R^9)_2$, $-LP(O)(OR^8)_2$, $-LOP(O)(OR^8)_2$, $-LP(O)(OR^{10})_2$ и $-OLP(O)(OR^{10})_2$;

каждый R^A независимо выбран из $-R^8$, $-R^7$, $-OR^7$, $-OR^8$, $-R^{10}$, $-OR^{10}$, $-SR^8$, $-NO_2$, $-CN$, $-N(R^9)_2$, $-NR^9C(O)R^8$, $-NR^9C(S)R^8$, $-NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9C(S)N(R^9)_2$, $-NR^9CO_2R^8$, $-NR^9NR^9C(O)R^8$, $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$, $-NR^9NR^9CO_2R^8$, $-C(O)C(O)R^8$, $-C(O)CH_2C(O)R^8$, $-CO_2R^8$, $-(CH_2)_nCO_2R^8$, $-C(O)R^8$, $-C(S)R^8$, $-C(O)N(R^9)_2$, $-C(S)N(R^9)_2$, $-OC(O)N(R^9)_2$, $-OC(O)R^8$, $-C(O)N(OR^8)R^8$, $-C(NOR^8)R^8$, $-S(O)_2R^8$, $-S(O)_3R^8$, $-SO_2N(R^9)_2$, $-S(O)R^8$, $-NR^9SO_2N(R^9)_2$, $-NR^9SO_2R^8$, $-P(O)(OR^8)_2$, $-OP(O)(OR^8)_2$, $-P(O)(OR^{10})_2$, $-OP(O)(OR^{10})_2$, $-N(OR^8)R^8$, $-CH=CHCO_2R^8$, $-C(=NH)-N(R^9)_2$ и $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$;

n, независимо в каждом случае, равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6, и

t равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; или (с) фармацевтически приемлемую соль любого из (а) или (b). Другие соединения бензонафтиридина и способы получения соединений бензонафтиридина описаны в WO 2009/111337. Соединение бензонафтиридина или его соль можно применять само по себе или в комбинации с одним или более другими соединениями. Например, соединение бензонафтиридина можно использовать в комбинации с эмульсией типа "масло-в-воде" или содержащей минерал композицией. В конкретном варианте осуществления соединения бензонафтиридина используют в комбинации с эмульсией типа "масло-в-воде" (например эмульсия типа сквален-вода,

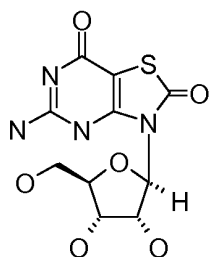
такая как MF59) или содержащей минерал композицией (например, минеральной солью, такой как соль алюминия или соль кальция).

- Соединение тиосемикарбазона, такое как соединения, описанные в ссылке 94.

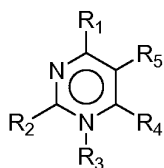
Способы составления, изготовления и скрининга активных соединений также описаны в ссылке 94. Тиосемикарбазоны являются особенно эффективными в отношении стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови человека для продукции цитокинов, таких как TNF- α .

- Соединение триптантрина, такое как соединения, описанные в ссылке 95. Способы составления, изготовления и скрининга активных соединений также описаны в ссылке 95. Тиосемикарбазоны являются особенно эффективными в отношении стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови человека для продукции цитокинов, таких как TNF- α .

- Нуклеозидный аналог, такой как: (a) изаторабин (ANA-245; 7-тиа-8-оксогуанозин):



и его пролекарства; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) соединения, описанные в ссылках с 96 по 98; (f) соединения, имеющие формулу:

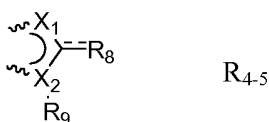


где:

каждый из R_1 и R_2 независимо представляют собой H, галоген, $-NR_aR_b$, $-OH$, C_{1-6} алкокси, замещенный C_{1-6} алкокси, C_{1-6} гетероцикл, замещенный гетероцикл, C_{6-10} арил, замещенный C_{6-10} арил, C_{1-6} алкил или замещенный C_{1-6} алкил;

R_3 отсутствует, представляет собой H, C_{1-6} алкил, замещенный C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, замещенный C_{6-10} арил, гетероцикл или замещенный гетероцикл;

каждый из R_4 и R_5 независимо представляет собой H, галоген, гетероцикл, замещенный гетероцикл, $-C(O)-R_d$, C_{1-6} алкил, замещенный C_{1-6} алкил, или они связаны друг с другом с образованием 5-членного кольца, как в $R_{4,5}$:

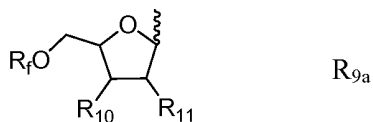


причем связывания достигают в связях, указанных посредством $\sim$ каждый из X_1 и X_2 независимо представляет собой N, C, O или S;

R_8 представляет собой H, галоген, $-OH$, C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, $-OH$, $-NR_aR_b$, $-(CH_2)_n-O-R_c$, $-O-(C_{1-6}алкил)$, $-S(O)_pR_e$ или $-C(O)-R_d$;

R_9 представляет собой H, C_{1-6} алкил, замещенный C_{1-6} алкил, гетероцикл,

замещенный гетероциклил или R_{9a} , где R_{9a} представляет собой:



причем связывания достигают по связи, указанной посредством ~~~
каждый из R_{10} и R_{11} независимо представляет собой H, галоген, C_{1-6} алкокси,
замещенный C_{1-6} алкокси, $-NR_aR_b$, или $-OH$;

каждый из R_a и R_b независимо представляет собой H, C_{1-6} алкил, замещенный
 C_{1-6} алкил, $-C(O)R_d$, C_{6-10} арил;

каждый R_c независимо представляет собой H, фосфат, дифосфат, трифосфат, C_{1-6} алкил
или замещенный C_{1-6} алкил;

каждый R_d независимо представляет собой H, галоген, C_{1-6} алкил, замещенный
 C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, замещенный C_{1-6} алкокси, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$ алкил), $-NH$ (замещенный
 C_{1-6} алкил), $-N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $-N$ (замещенный C_{1-6} алкил) $_2$, C_{6-10} арил или гетероциклил;

каждый R_e независимо представляет собой H, C_{1-6} алкил, замещенный C_{1-6} алкил, C_{6-10}
арил, замещенный C_{6-10} арил, гетероциклил или замещенный гетероциклил;

каждый R_f независимо представляет собой H, C_{1-6} алкил, замещенный C_{1-6} алкил, $-C$
(O) R_d , фосфат, дифосфат или трифосфат;

каждый n независимо представляет собой 0, 1, 2 или 3;

каждый p независимо представляет собой 0, 1, или 2; или

(g) фармацевтически приемлемая соль любого из с (a) по (f), таутомер любого из с
(a) по (f), или фармацевтически приемлемая соль таутомера.

- Локсорибин (7-аллил-8-оксогуанозин) (99).

- Соединения, описанные в ссылке 100, включая: соединения ацилпиперазина,
соединения индолдиона, соединения тетрагидраизохинолина (THIQ), соединения
бензоциклодиона, аминоказавинильные соединения, соединения
аминобензимидазолхинолинона (ABIQ) (101, 102), соединения гидрафталамида,
соединения бензофенона, соединения изоксазола, соединения стерина, соединения
квиназилинона, соединения пиррола (103), соединения антрахинона, соединения
хиноксалина, соединения триазина, соединения пиразолопиримидина и соединения
бензазола (104).

- Соединения, описанные в ссылке (105)

- Производное аминоктилглюкозаминидфосфата, такое как RC-529 (106, 107).

- Фосфазен, такой как поли[ди(карбоксилатофеноксид)фосфазен] ("PCPP"), как
описано, например, в ссылках 108 и 109.

- Низкомолекулярные иммуностимуляторы (SMIP), такие как:

N2-метил-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2,N2-диметил-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-этил-N2-метил-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-метил-1-(2-метилпропил)-N2-пропил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

1-(2-метилпропил)-N2-пропил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-бутил-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-бутил-N2-метил-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-метил-1-(2-метилпропил)-N2-пентил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин

N2-метил-1-(2-метилпропил)-N2-проп-2-енил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-диамин
 1-(2-метилпропил)-2-[(фенилметил)тио]-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин
 1-(2-метилпропил)-2-(пропилтио)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин
 2-[[4-амино-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2-ил](метил)амино]этанол
 2-[[4-амино-1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2-ил](метил)амино]
 этилацетат
 4-амино-1-(2-метилпропил)-1,3-дигидро-2H-имидазо[4,5-с]хинолин-2-он
 N2-бутил-1-(2-метилпропил)-N4,N4-бис(фенилметил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-
 диамин
 N2-бутил-N2-метил-1-(2-метилпропил)-N4,N4-бис(фенилметил)-1H-имидазо[4,5-с]
 хинолин-2,4-диамин
 N2-метил-1-(2-метилпропил)-N4,N4-бис(фенилметил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-2,4-
 диамин
 N2,N2-диметил-1-(2-метилпропил)-N4,N4-бис(фенилметил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-
 2,4-диамин
 1-{4-амино-2-[метил(пропил)амино]-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-1-ил}-2-метилпропан-
 2-ол
 1-[4-амино-2-(пропиламино)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-1-ил]-2-метилпропан-2-ол
 N4,N4-дибензил-1-(2-метокси-2-метилпропил)-N2-пропил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-
 2,4-диамин.

Индуцирующие цитокин средства для применения в настоящем изобретении могут представлять собой модуляторы и/или агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR). Например, они могут представлять собой агонисты одного или более из белков TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 и/или TLR9 человека. Предпочтительными средствами являются агонисты TLR4 (например, модифицированный природный липид As, происходящий из липополисахаридов энтеробактерий, соединения фосфолипидов, такие как синтетический димер фосфолипида, E6020), TLR7 (например, имидазохинолины) и/или TLR9 (например, CpG-олигонуклеотиды). Эти средства пригодны для активации каскадов врожденного иммунитета.

Индуцирующее цитокин средство можно добавлять в композицию на различных стадиях в ходе ее изготовления. Например, оно может находиться в антигенной композиции, и затем эту смесь можно добавлять в эмульсию типа "масло-в-воде". В качестве альтернативы, оно может находиться в эмульсии типа "масло-в-воде", и в этом случае средство можно либо добавлять к компонентам эмульсии перед эмульгированием, либо его можно добавлять в эмульсию после эмульгирования. Аналогично, средство может подвергаться слиянию в каплях эмульсии. Расположение и распределение индуцирующего цитокин средства в конечной композиции может зависеть от его гидрофильных/липофильных свойств, например, средство может быть расположено в водной фазе, в масляной фазе и/или на границе масло-вода.

Индуцирующее цитокин средство может быть конъюгированным с отдельным средством, таким как антиген (например CRM197). Общий обзор способов конъюгации низкомолекулярных соединений предоставлен в ссылке 110. В качестве альтернативы, адъюванты могут быть нековалентно связаны с дополнительными средствами, например, посредством гидрофобных или ионных взаимодействий.

Предпочтительные индуцирующие цитокин средства представляют собой (a) соединения бензонафтиридина, (b) иммуностимулирующие олигонуклеотиды и (c) 3dMPL.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды могут включать модификации/аналоги

нуклеотидов, такие как фосфоротиоатные модификации, и они могут быть двухцепочечными или (исключение для РНК) одноцепочечными. В ссылках 111, 112 и 113 описаны возможные замены для аналогов, например, замена гуанозина 2'-дезоксигуанозином. Адъювантный эффект олигонуклеотидов CpG дополнительно рассмотрен в ссылках 114-119. Последовательность CpG может быть направлена на TLR9, например, мотив GTCGTT или TTCGTT (120). Последовательность CpG может быть специфичной для индукции Th1-иммунного ответа, например, CpG-A ODN (олигодезоксинуклеотида), или она может быть специфичной для индукции В-клеточного ответа, например, CpG-B ODN. CpG-A и CpG-B ODN рассмотрены в ссылках 121-123. Предпочтительно, CpG представляет собой CpG-A ODN. Предпочтительно, CpG-олигонуклеотид сконструирован так, чтобы 5'-конец был доступен для распознавания рецептором. Необязательно, две последовательности CpG-олигонуклеотидов могут быть связаны на их 3'-концах с образованием "иммуномеров". См., например, ссылки 120 и 124-126. Пригодным CpG-адъювантом является CpG7909, также известный как PROMUNETM (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

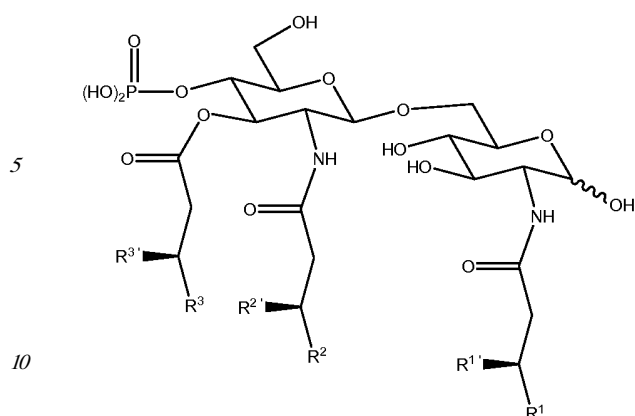
Альтернативно или дополнительно к применению последовательностей CpG, можно использовать последовательности TrpG (127). Эти олигонуклеотиды могут не содержать неметилированных мотивов CpG.

Иммуностимулирующий олигонуклеотид может быть богатым пиримидинами. Например, он может содержать более одного последовательно расположенного тимидинового нуклеотида (например, TTTT, как описано в ссылке 127), и/или он может иметь нуклеотидный состав с >25% тимидина (например >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, и т.д.). Например, он может содержать более одного последовательно расположенного цитозинового нуклеотида (например CCCC, как описано в ссылке 127), и/или он может иметь нуклеотидный состав с >25% цитозина (например >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, и т.д.). Эти олигонуклеотиды могут не содержать неметилированных мотивов CpG.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды, как правило, содержат, по меньшей мере, 20 нуклеотидов. Они могут содержать менее 100 нуклеотидов.

3dMPL (также известный как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А или 3-О-дезацил-4'-монофосфориллипид А) представляет собой адъювант, в котором положение 3 глюкозамина с восстанавливающим концом в монофосфориллипиде А является деацетилированным. 3dMPL получают из не содержащего гептоз мутанта *Salmonella minnesota*, и он химически сходен с липидом А, но лишен неустойчивой к кислотам фосфорильной группы и неустойчивой к основаниям ацильной группы. Он активизирует клетки моноцитарного/макрофагального ростка и стимулирует высвобождение нескольких цитокинов, включая IL-1, IL-12, TNF-α и GM-CSF (также см. ссылку 128). Получение 3dMPL исходно было описано в ссылке 129.

3dMPL может иметь форму смеси сходных молекул, отличающихся их ацилированием (например, имеющих 3, 4, 5 или 6 ацильных цепей, которые могут иметь различные длины). Два моносахарида глюкозамина (также известного как 2-дезоксиглюкоза) являются N-ацилированными по их углеродам во 2 положении (т.е. в положениях 2 и 2'), и также они имеют О-ацилирование в 3'-положении. Группа, связанная со 2 углеродом имеет формулу -NH-CO-CH₂-CR¹R^{1'}. Группа, связанная со 2' углеродом, имеет формулу -NH-CO-CH₂-CR²R^{2'}. Группа, связанная с 3'-углеродом, имеет формулу -O-CO-CH₂-CR³R^{3'}. Типичной структурой является:



Каждая из групп R^1 , R^2 и R^3 независимо представляют собой $-(CH_2)_n-CH_3$. Значение n предпочтительно составляет между 8 и 16, более предпочтительно между 9 и 12, и наиболее предпочтительно оно составляет 10.

Каждая из групп $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$ независимо может представлять собой: (а) -H; (b) -OH; или (с) $-O-CO-R^4$, где R^4 представляет собой либо -H, либо $-(CH_2)_m-CH_3$, где значение m предпочтительно составляет между 8 и 16, и более предпочтительно оно составляет 10, 12 или 14. Во 2 положении, m предпочтительно составляет 14. Во 2' положении, m предпочтительно составляет 10. В 3' положении, m предпочтительно составляет 12.

Группы $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$, таким образом, предпочтительно представляют собой -О-ацильные группы из додекановой кислоты, тетрадекановой кислоты или гексадекановой кислоты.

Когда все из $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$ представляют собой -H, тогда 3dMPL имеет только 3 ацильных цепи (по одной в каждом из положений 2, 2' и 3'). Когда только два из $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$ представляют собой -H, тогда 3dMPL может иметь 4 ацильных цепи. Когда только один из $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$ представляет собой -H, тогда 3dMPL может иметь 5 ацильных цепей.

Когда ни один из $R^{1'}$, $R^{2'}$ и $R^{3'}$ не представляет собой -H, тогда 3dMPL может иметь 6 ацильных цепей. Адъювант 3dMPL, используемый в соответствии с изобретением, может представлять собой смесь этих форм, имеющих от 3 до 6 ацильных цепей, однако предпочтительно он включает 3dMPL с 6 ацильными цепями в смеси, и, в частности, обеспечивает, чтобы форма гексоацильной цепи составляла, по меньшей мере, 10% по массе от всего 3dMPL например >20%, >30%, >40%, >50% или более. Было выявлено, что 3dMPL с 6 ацильными цепями является наиболее адъювантно-активной формой.

Таким образом, наиболее предпочтительная форма 3dMPL для включения в композиции по изобретению имеет формулу (IV), представленную ниже.

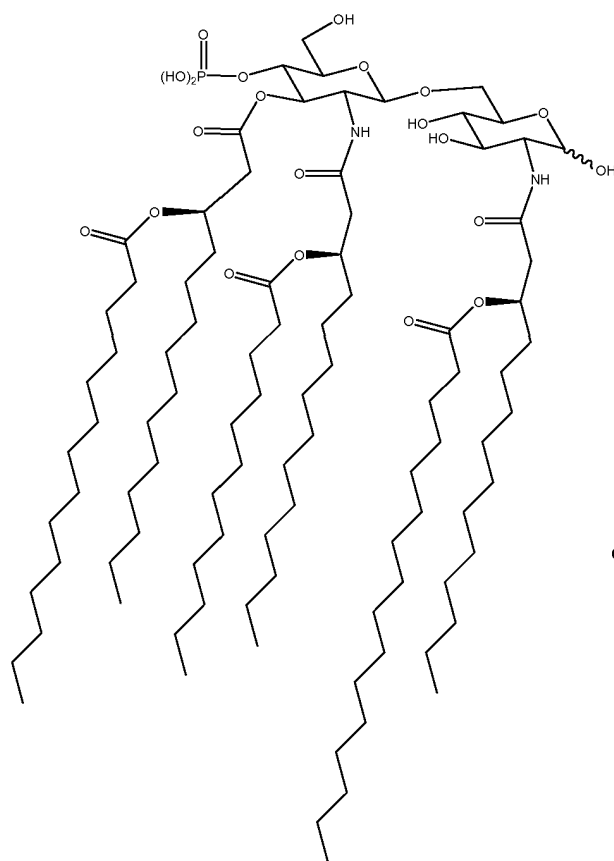
Когда 3dMPL используют в форме смеси, то указания на количества или концентрации 3dMPL в композициях по изобретению относятся к комбинированным видам 3dMPL в смеси.

В водных условиях, 3dMPL может образовывать мицеллярные агрегаты или частицы с различными размерами, например, с диаметром <150 нм или >500 нм. Любой или оба из них можно использовать в соответствии с изобретением, и лучшие частицы можно отбирать посредством общепринятого анализа. Более мелкие частицы (например, достаточно маленькие для получения прозрачной водной суспензии 3dMPL) являются предпочтительными для применения в соответствии с изобретением, вследствие их более высокой активности (130). Предпочтительные частицы имеют средний диаметр

менее 220 нм, более предпочтительно менее 200 нм или менее 150 нм или менее 120 нм, и они могут даже иметь средний диаметр менее 100 нм. Однако в большинстве случаев, средний диаметр не будет составлять менее 50 нм. Эти частицы являются достаточно небольшими, чтобы быть пригодными для стерилизации фильтрацией. Диаметр частиц можно оценивать общепринятым способом динамического рассеяния света, который выявляет средний размер частиц. Когда говорят, что частицы имеют диаметр x нм, тогда распределение частиц, как правило, будет в области этого среднего значения, однако, по меньшей мере, 50% по числу (например >60%, >70%, >80%, >90% или более) частиц будут иметь диаметр в диапазоне $x \pm 25\%$.

3dMPL можно преимущественно использовать в сочетании с эмульсией типа "масло-в-воде". По существу все из 3dMPL могут быть расположены в водной фазе эмульсии.

3dMPL можно использовать отдельно или в комбинации с одним или более другими соединениями. Например, известно применение 3dMPL в сочетании с сапонином QS21 (131) (включая эмульсию типа "масло-в-воде" (132)), с иммуностимулирующим олигонуклеотидом, как с QS21, так и с иммуностимулирующим олигонуклеотидом, с фосфатом алюминия (133), с гидроксидом алюминия (134), или как с фосфатом алюминия, так и с гидроксидом алюминия.

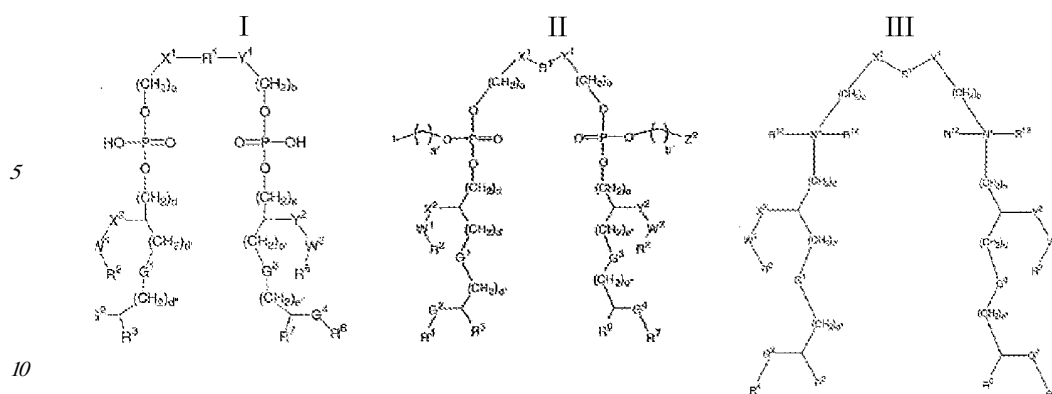


Формула (IV)

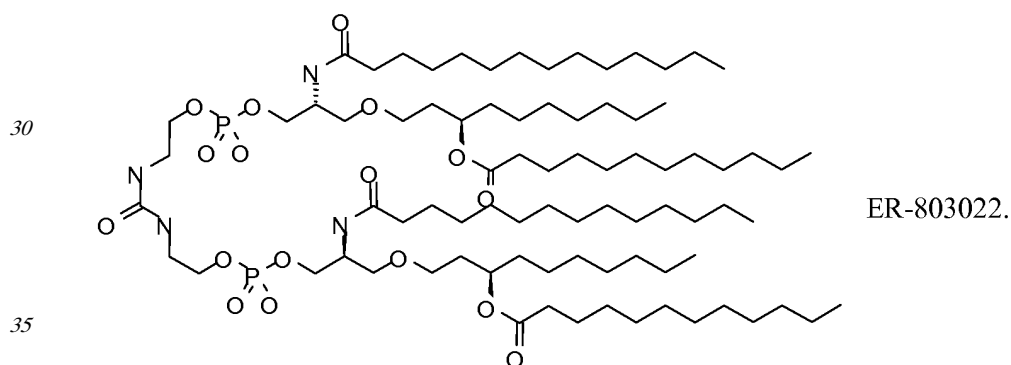
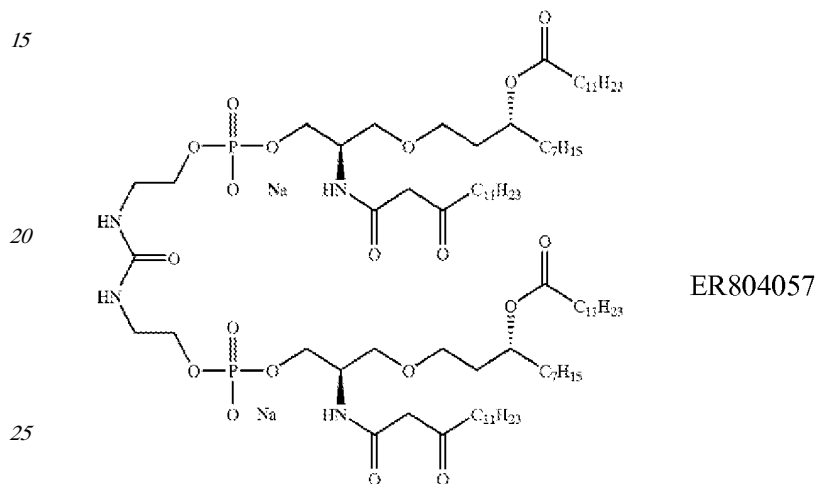
Жировые адъюванты

Жировые адъюванты, которые можно использовать по изобретению, включают эмульсии типа "масло-в-воде", описанные выше, а также включают, например:

- Соединение формулы I, II или III, или его соль:



как определено в ссылке 135, такое как "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", "ER 803022" или "ER 804057", например:



ER804057 также называется E6020. Соединение фосфолипида формулы I, II или III или его соль можно использовать само по себе или в комбинации с одним или более другими соединениями. Например, соединение формулы I, II или III можно использовать в комбинации с эмульсией типа "масло-в-воде" эмульсия или содержащей минерал композицией. В конкретном варианте осуществления E6020 используют в комбинации с эмульсией типа "масло-в-воде" (например эмульсия типа сквален-вода, такая как MF59) или содержащей минерал композицией (например, соль минерала, такая как соль алюминия или соль кальция).

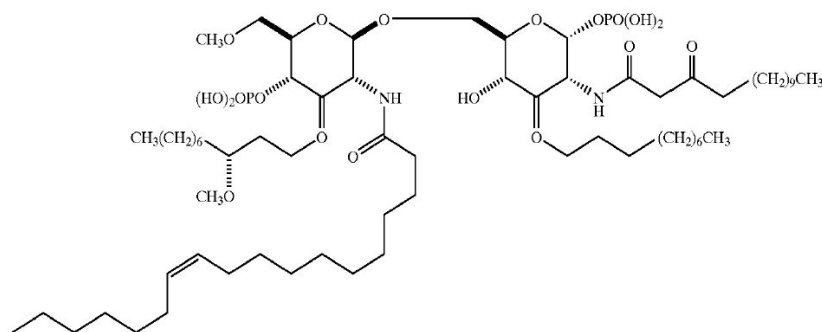
- Производные липида A из *Escherichia coli*, такие как OM-174 (описанные в ссылках 136 и 137).

- Состав катионного липида и (как правило, нейтрального) колипида, такого как бромид аминопропилдиметилмиристолеилоксипропанаминия-

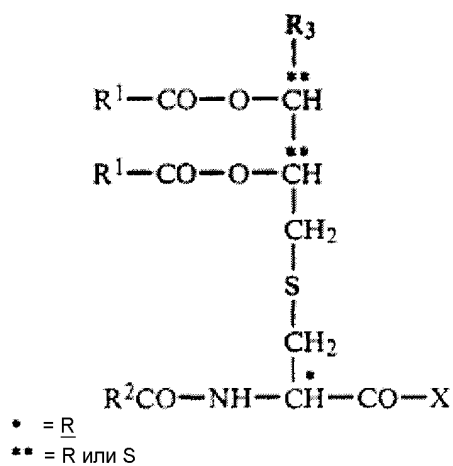
дифитаноилфосфатидилэтаноламин ("VAXFECTINTM") или бромид
аминопропилдиметил-бис-додецилоксипропанаминия-диолеилфосфатидилэтаноламин
("GAP-DLRIE:DOPE"). Составы, содержащие соли (+)-N-(3-аминопропил)-N,N-диметил-
2,3-бис(син-9-тетрадеценилокси)-1-пропанаминия являются предпочтительными (138).

- 3-О-даацетилованный монофосфориллипид А (см. выше).

- Соединения, содержащие липиды, связанные с содержащим фосфат ациклическим
остовом, такие как антагонист TLR4 E5564 (139, 140):



Липопептиды (т.е., соединения, содержащие один или более остатков жирной кислоты
и два или более аминокислотных остатка), такие как липопептиды на основе
глицерилцистеина. Конкретные примеры таких пептидов включают соединения
следующей формулы:

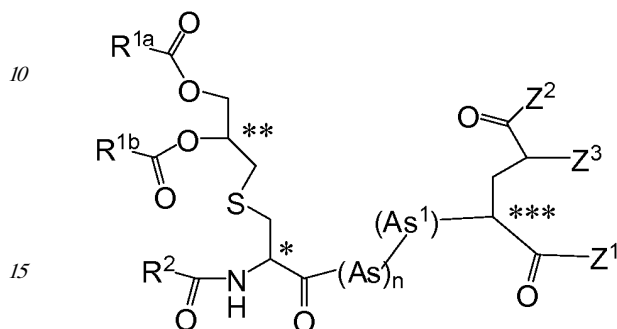


в которых каждый из R¹ и R² представляет собой насыщенный или ненасыщенный,
алифатический или смешанный алифатический-циклоалифатический углеводородный
радикал, имеющий от 8 до 30, предпочтительно от 11 до 21, атомов углерода, который
необязательно также замещен функциональными группами кислорода, R³ представляет
собой водород или радикал R¹-CO-O-CH₂-, в котором R¹ имеет то же значение, что и
указано выше, и X представляет собой аминокислоту, связанную пептидной связью и
имеющую свободную, этерифицированную или амидированную карбоксигруппу, или
аминокислотную последовательность из 2-10 аминокислот, в которой концевая
карбоксигруппа находится в свободной, этерифицированной или амидированной форме.
В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность
содержит D-аминокислоту, например, D-глутаминовую кислоту (D-Glu) или D-гамма-
карбоксиглутаминовую кислоту (D-Gla).

Бактериальные липопептиды, как правило, распознают TLR2, не требуя участия
TLR6. (TLR действуют совместно, обеспечивая специфическое распознавание различных

пусковых факторов, и TLR2 вместе с TLR6 распознают пептидогликаны, в то время как TLR2 без TLR6 распознает липопептиды.) Их иногда классифицируют как природные липопептиды и синтетические липопептиды. Синтетические липопептиды имеют тенденцию к сходному поведению, и, главным образом, распознаются посредством

Липопептиды, пригодные для применения в качестве адъювантов, включают соединения формулы:



где оба из хирального центра, обозначенного *, и хирального центра, обозначенного ***, находятся в R-конфигурации;

хиральный центр, обозначенный **, находится либо в R-, либо в S-конфигурации;

каждый из R^{1a} и R^{1b} независимо представляет собой алифатическую или циклоалифатическую-алифатическую углеводородную группу, имеющую 7-21 атомов углерода, необязательно замещенную функциональными группами кислорода, или

один из R^{1a} и R^{1b} , но не оба, представляет собой H;

R^2 представляет собой алифатическую или циклоалифатическую углеводородную группу, имеющую 1-21 атомов углерода и, необязательно, замещенную функциональными группами кислорода;

n равно 0 или 1;

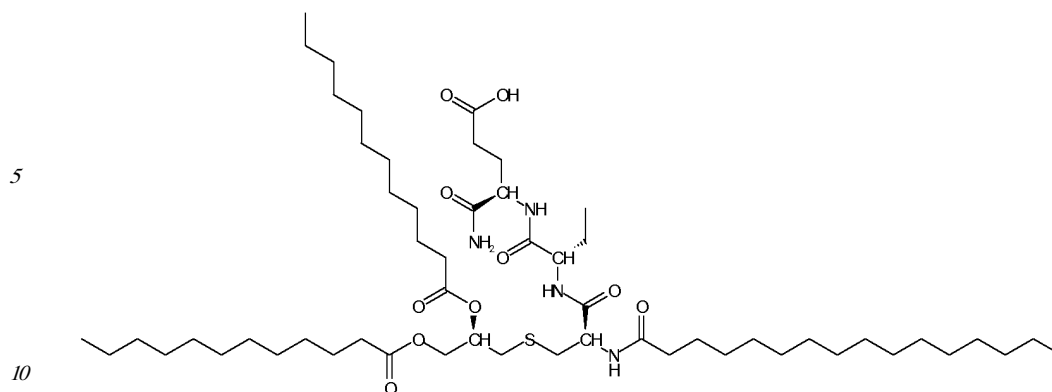
As представляет собой либо -O-Kw-CO-, либо -NH-Kw-CO-, где Kw представляет собой алифатическую углеводородную группу, имеющую 1-12 атомов углерода;

As^1 представляет собой D- или L-альфа-аминокислоту;

Каждый из Z^1 и Z^2 независимо представляет собой -ОН или N-концевой радикал D- или L-альфа аминокислоты в аминок-(низший алкан)-сульфоновой кислоте или пептиде, имеющем вплоть до 6 аминокислот, выбранных из D- и L-альфа-аминокарбоновых кислот и аминок-низший алкил-сульфоновых кислот; и

Z^3 представляет собой H или -CO- Z^4 , где Z^4 представляет собой -ОН или N-концевой радикал D- или L-альфа-аминокислоты в аминок-(низший алкан)-сульфоновой кислоте или пептиде, имеющем вплоть до 6 аминокислот, выбранных из D и L-альфа-аминокарбоновых кислот и аминок-низший алкил-сульфоновых кислот; или сложный эфир или амид, образованные из карбоновой кислоты таких соединений. Пригодные амиды включают -NH₂ и NH(низший алкил), и пригодные сложные эфиры включают C1-C4 алкиловые сложные эфиры. (Низший алкил или низший алкан, как используют в настоящем документе, относится к C₁-C₆ неразветвленным или разветвленным алкилам).

Такие соединения более подробно описаны в US 4666886. В одном конкретном варианте осуществления липопептид имеет формулу:



Другой пример типа липопептидов называется LP40, и они являются агонистами TLR2. Akdis, et al., *Eur. J. Immunology*, 33: 2717-26 (2003). Они являются родственными известному классу липопептидов из *E. coli*, называемому муреин-липопротеинами.

15 Определенные продукты неполной деградации этих белков, названные муреин-липопептидами, описаны в Hantke, et al., *Eur. J. Biochem.*, 34: 284-296 (1973). Они содержат пептид, связанный с N-ацетил-муравовой кислотой и, таким образом, являются родственными мурамилпептидам, которые описаны в Baschang, et al., *Tetrahedron*, 45 (20): 6331-6360 (1989).

20 Адъюванты на основе солей алюминия

Можно использовать адъюванты, известные как "гидроксид алюминия" и "фосфат алюминия". Эти названия являются общепринятыми, однако их используют только для удобства, поскольку ни один из них не имеет точного описания действительного химического соединения, которое существует (например, см. глава 9 ссылки 74). В

25 изобретении можно использовать любой из "гидроксидных" или "фосфатных" адъювантов, которые обычно используют в качестве адъювантов.

Адъюванты, известные в качестве "гидроксида алюминия", как правило, представляют собой соли оксигидроксида алюминия, которые, как правило, являются, по меньшей мере, частично кристаллическими. Оксигидроксид алюминия, который может быть

30 представлен формулой $\text{AlO}(\text{OH})$, можно отличить от других соединений алюминия, таких как гидроксид алюминия $\text{Al}(\text{OH})_3$, с помощью инфракрасной (IR) спектроскопии, в частности, по наличию полосы поглощения при 1070 см^{-1} и выраженного плеча при $3090\text{-}3100 \text{ см}^{-1}$ (глава 9 ссылки 74). Степень кристалличности адъюванта на основе

35 гидроксида алюминия отражается шириной полосы дифракции при половине высоты (WHN), со слабо кристаллическими частицами, демонстрирующими большее расширение линий вследствие меньших кристаллических размеров. Площадь поверхности возрастает по мере повышения WHN, и было выявлено, что адъюванты с более высокими значениями WHN имеют более высокую способность к поглощению антигена.

40 Волокнистая морфология (например, как видно на трансмиссионных электронных микрофотографиях) является типичной для адъювантов на основе гидроксида алюминия. рI адъювантов на основе гидроксида алюминия, как правило, составляет приблизительно 11, т.е. адъювант сам по себе имеет положительный заряд на поверхности при физиологических значениях pH. Для адъювантов на основе гидроксида алюминия были

45 описаны поглощающие способности между 1,8-2,6 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Адъюванты, известные как "фосфат алюминия", как правило, представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто также содержащие небольшие количества сульфата (т.е. сульфат гидроксифосфата алюминия). Их можно получать осаждением, и условия

реакции и концентрация в ходе осаждения влияют на степень замещения фосфатом гидроксила в соли. Гидроксифосфаты, как правило, имеют молярное отношение PO_4/Al между 0,3 и 1,2. Гидроксифосфаты можно отличить от строго AlPO_4 наличием

гидроксильных групп. Например, полоса спектра IR при 3164 см^{-1} (например, при нагревании до 200°C) указывает на наличие структурных гидроксидов (глава 9 ссылки 74).

Молярное отношение $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ адьюванта на основе фосфата алюминия, как правило, может находиться между 0,3 и 1,2, предпочтительно, между 0,8 и 1,2, и более предпочтительно оно может составлять 0,95+0,1. Фосфат алюминия, как правило, может быть аморфным, в частности, для гидроксифосфатных солей. Типичным адьювантом является аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением PO_4/Al между 0,84 и 0,92, включенный в количестве 0,6 мг $\text{Al}^{3+}/\text{мл}$. Фосфат алюминия, как правило, может представлять собой твердые частицы (например, он может иметь пластинчатую морфологию при наблюдении на трансмиссионных электронных микрофотографиях). Типичные диаметры частиц находятся в диапазоне 0,5-20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм) после адсорбции антигена. Для адьювантов на основе фосфата алюминия описана адсорбционная способность между 0,7-1,5 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия обратно пропорционально связана со степенью замещения фосфатом гидроксила, и эта степень замещения может варьировать в зависимости от условий реакции и концентрации реагентов, используемых для получения соли осаждением. PZC также изменяется при изменении концентрации свободных фосфатных ионов в растворе (большее количество фосфата = более кислая PZC) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает PZC более основным). Фосфаты алюминия, используемые в соответствии с изобретением, как правило, могут иметь PZC между 4,0 и 7,0, более предпочтительно между 5,0 и 6,5 например, приблизительно 5,7.

Суспензии солей алюминия, используемые для получения композиций по изобретению, могут содержать буфер (например, фосфатный или гистидиновый буфер или буфер Tris), однако это не всегда необходимо. Суспензии предпочтительно являются стерильными и не содержат пирогенов. Суспензия может включать свободные водные ионы фосфата, например, присутствующие в концентрации между 1,0 и 20 мМ, предпочтительно между 5 и 15 мМ, и более предпочтительно приблизительно 10 мМ. Также суспензии могут содержать хлорид натрия.

В изобретении можно использовать смесь как гидроксида алюминия, так и фосфата алюминия. В этом случае, фосфата алюминия может быть больше, чем гидроксида алюминия например, в массовом соотношении, по меньшей мере, 2:1 например >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1 и т.д.

Концентрация Al^{+++} в композиции для введения пациенту предпочтительно составляет менее 10 мг/мл например, <5 мг/мл, <4 мг/мл, <3 мг/мл, <2 мг/мл, <1 мг/мл и т.д. Предпочтительный диапазон составляет между 0,3 и 1 мг/мл. Предпочтительным является максимум 0,85 мг/доза.

Помимо включения одного или более адьювантов на основе солей алюминия, адьювантный компонент может включать один или более дополнительных адьювантов или иммуностимулирующих средств. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничиваются ими: адьювант на основе 3-О-деацелированного

монофосфориллипида А ("3d-MPL"); и/или эмульсию типа "масло-в-воде". 3d-MPL также обозначают как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А или 3-О-деацил-4'-монофосфориллипид А. Название указывает на то, что положение 3 глюкозамина с восстанавливающим концом в монофосфориллипиде А является деацилированным.

Его получают из не содержащего гептоз мутанта *S. minnesota*, и он химически сходен с липидом А, но лишен неустойчивой к кислотам фосфорильной группы и неустойчивой к основаниям ацильной группы. Он активует клетки моноцитарного/макрофагального ростка и стимулирует высвобождение нескольких цитокинов, включая IL-1, IL-12, TNF- α и GM-CSF. Получение 3d-MPL исходно было описано в ссылке 129, и продукт

изготавливается и продается Corixa Corporation под названием MPLTM. Дальнейшие детали могут быть найдены в ссылках с 82 по 85.

Применение адъюванта на основе гидроксида алюминия и/или фосфата алюминия пригодно, в частности у детей, и антигены, как правило, адсорбируют на эти соли. Также предпочтительными являются эмульсии типа "скавален-в-воде", в частности у пожилых. Пригодные комбинации адъювантов включают комбинации Th1- и Th2-адъювантов, такие как CpG и квасцы, или резиквимод и квасцы. Можно использовать комбинацию фосфата алюминия и 3dMPL. Другие комбинации, которые можно использовать, включают: квасцы и соединение бензонафтиридина или SMIP, эмульсию типа "скавален-в-воде" (такую как MF59) и соединение бензонафтиридина или SMIP, и E6020 и эмульсия типа "скавален-в-воде", (такая как MF59) или квасцы.

Композиции по изобретению могут индуцировать как клеточно-опосредуемый иммунный ответ, так и гуморальный иммунный ответ.

Главным образом, полагают, что для инициации и/или усиления клеточно-опосредуемого иммунитета и гуморального иммунитета необходимо два типа Т-клеток, CD4- и CD8-клетки. CD8 Т-клетки могут экспрессировать корецептор CD8 и обычно их называют цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). CD8 Т-клетки способны распознавать и взаимодействовать с антигенами, экспонированными на молекулах МНС класса I.

CD4 Т-клетки могут экспрессировать корецептор CD4 и обычно их называют Т-хелперными клетками. CD4 Т-клетки способны распознавать антигенные пептиды, связанные с молекулами МНС класса II. При взаимодействии с молекулой МНС класса II, CD4-клетки могут секретировать факторы, такие как цитокины. Эти секретируемые цитокины могут активировать В-клетки, цитотоксические Т-клетки, макрофаги и другие клетки, которые участвуют в иммунном ответе. Хелперные Т-клетки или CD4+ клетки можно далее подразделить на две функционально отличающихся подгруппы: TH1-фенотип и TH2-фенотип, которые отличаются их цитокинами и эффекторными функциями.

Активированные TH1-клетки усиливают клеточный иммунитет (включая увеличение продукции антигенспецифических CTL) и, таким образом, имеют особое значение при ответе на внутриклеточные инфекции. Активированные TH1-клетки могут секретировать один или более из IL-2, IFN- γ и TNF- β . TH1-иммунный ответ может приводить к локальным воспалительным реакциям путем активации макрофагов, NK (естественных киллерных) клеток и CD8 цитотоксических Т-клеток (CTL). TH1-иммунный ответ также может действовать, расширяя иммунный ответа путем стимуляции роста В- и Т-клеток посредством IL-12. TH1-стимулированные В-клетки могут секретировать IgG2a.

Активированные TH2-клетки усиливают продукцию антител и, таким образом, имеют значение при ответе на внеклеточные инфекции. Активированные TH2-клетки могут секретировать один или более из IL-4, IL-5, IL-6, и IL-10. TH2-иммунный ответ может

приводить к продукции IgG1, IgE, IgA и В-клеток памяти для будущей защиты.

Усиленный иммунный ответ может включать один или более из усиленного ТН1-иммунного ответа и ТН2-иммунного ответа.

ТН1-иммунный ответ может включать одно или более из увеличения количества
 5 СТЛ, увеличения уровня одного или более цитокинов, ассоциированных с ТН1-иммунным
 ответом (таких как IL-2, IFN- γ и TNF- β), увеличения количества активированных
 макрофагов, увеличения активности NK или увеличения продукции IgG2a.
 Предпочтительно, усиленный ТН1-иммунный ответ включает увеличение продукции
 IgG2a.

10 ТН1-иммунный ответ можно индуцировать с использованием ТН1-адьюванта. ТН1-
 адьювант обычно индуцирует увеличенные уровни продукции IgG2a относительно
 иммунизации антигеном без адьюванта. ТН1-адьюванты, пригодные для применения
 в изобретении, могут включать, например, составы сапонины, виросомы и
 15 вирусоподобные частицы, нетоксичные производные липополисахарида энтеробактерий
 (LPS), иммуностимулирующие олигонуклеотиды. Иммуностимулирующие
 олигонуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, являются
 предпочтительными ТН1-адьювантами для применения в изобретении.

ТН2-иммунный ответ может включать одно или более из увеличения уровня одного
 или более цитокинов, ассоциированных с ТН2-иммунным ответом (таких как IL-4, IL-
 20 5, IL-6 и IL-10), или увеличения продукции IgG1, IgE, IgA и образования В-клеток памяти.
 Предпочтительно, усиленный ТН2-иммунный ответ включает увеличение продукции
 IgG1.

ТН2-иммунный ответ можно индуцировать с использованием ТН2-адьюванта. ТН2-
 адьювант, как правило, индуцирует увеличенные уровни продукции IgG1 относительно
 25 иммунизации антигеном без адьюванта. ТН2-адьюванты, пригодные для применения
 в изобретении, включают, например, содержащие минерал композиции, масляные
 эмульсии и ADP-рибозилирующие токсины и их детоксифицированные производные.
 Содержащие минерал композиции, такие как соли алюминия, являются
 предпочтительными ТН2-адьювантами для применения в изобретении.

30 Композиция может включать комбинацию ТН1-адьюванта и ТН2-адьюванта.
 Предпочтительно, такая композиция индуцирует усиленный ТН1- и усиленный ТН2-
 ответ, т.е. увеличение продукции как IgG1, так и IgG2a, относительно иммунизации без
 адьюванта. Еще более предпочтительно, композиция, содержащая комбинацию ТН1-
 и ТН2-адьюванта индуцирует увеличенный ТН1- и/или увеличенный ТН2-иммунный
 35 ответ относительно иммунизации одним адьювантом (т.е. относительно иммунизации
 ТН1-адьювантом отдельно или иммунизации ТН2 адьювантом отдельно).

Иммунный ответ может представлять собой один или оба из ТН1-иммунного ответа
 и ТН2-ответа. Предпочтительно, иммунный ответ обеспечивает один или более из
 усиленного ТН1-ответа и усиленного ТН2-ответа.

40 Усиленный иммунный ответ может представлять собой один или оба из системного
 иммунного ответа и иммунного ответа слизистой оболочки. Предпочтительно,
 иммунный ответ обеспечивает один или оба из усиленного системного иммунного
 ответа и усиленного иммунного ответа слизистой оболочки. Предпочтительно иммунный
 ответ слизистой оболочки представляет собой ТН2-иммунный ответ. Предпочтительно,
 45 иммунный ответ слизистой оболочки включает увеличение продукции IgA.

Способы лечения и введения

Композиции по изобретению пригодны для введения млекопитающему, и изобретение
 относится к способу индукции иммунного ответа у млекопитающего, включающему

стадию введения композиции (например, иммуногенной композиции) по изобретению млекопитающему. Композиции (например, иммуногенную композицию) можно использовать для получения вакцинного состава для иммунизации млекопитающего. Млекопитающим обычно является человек, и эктодомеом белка F RSV, как правило, является эктодомеом белка F RSV человека. Однако млекопитающим может быть любое млекопитающее, которое является восприимчивым к инфекции RSV, такое как корова, которую можно инфицировать бычьим RSV. Например, иммунный ответ можно индуцировать введением очищенного белка F RSV, частицы альфавируса и или самореплицирующейся РНК.

Также изобретение относится к композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения для иммунизации пациента против инфекции RSV.

Также изобретение относится к применению полипептида, как описано выше, для изготовления лекарственного средства для индукции иммунного ответа у пациента.

Иммунный ответ, индуцируемый этими способами и применениями, обычно включает антительный ответ, предпочтительно защитный антительный ответ. Способы оценки антительных ответов после вакцинации RSV хорошо известны в данной области.

Композиции по изобретению можно вводить рядом пригодных способов, таких как внутримышечная инъекция (например, руку или ногу), подкожная инъекция, интраназальное введение, пероральное введение, внутрикожное введение, чрескожное введение, трансдермальное введение и т.п. Соответствующий путь введения зависит от возраста, здоровья и других характеристик млекопитающего. Врач способен определить соответствующий путь введения на основе этих и других факторов.

Иммуногенные композиции и вакцинные составы можно применять для лечения как детей, так и взрослых, в том числе беременных женщин. Таким образом, возраст индивидуума может составлять менее 1 года, 1-5 лет, 5-15 лет, 15-55 лет, или, по меньшей мере, 55 лет. Предпочтительными для введения вакцин индивидуумами являются пожилые люди (например, >50 лет, >60 лет и предпочтительно >65 лет), молодые (например, <6 лет, как например, 4-6 лет, <5 лет) и беременные женщины. Однако вакцины пригодны не только для этих групп и их можно применять в целом в популяции.

Лечение можно проводить по схеме с одной дозой или по схеме со множеством доз. Множество доз можно использовать в схеме первичной иммунизации и/или в схеме вспомогательной иммунизации. В схеме со множеством доз различные дозы можно вводить одним и тем же или различными путями, например, первичную иммунизацию парентеральным путем, а вспомогательную иммунизацию введением на слизистую оболочку, первичную иммунизацию введением на слизистую оболочку и вторичную иммунизацию парентеральным путем, и т.д. Введение более чем одной дозы (как правило, двух доз) является особенно пригодным у иммунологически наивных пациентов. Множество доз, как правило, можно вводить с интервалом, по меньшей мере, 1 неделя (например приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 6 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 16 недель и т.д.).

Вакцинные составы, получаемые с использованием композиции по изобретению, можно вводить пациентам по существу одновременно (например, в ходе одной медицинской консультации или посещения работника здравоохранения или центра вакцинации) с другими вакцинами.

Другие аспекты изобретения

Также изобретение относится к полипептиду (например рекомбинантному

полипептиду), содержащему первый домен и второй домен, где (i) первый домен содержит эктодомен гликопротеина F RSV, целиком или частично, и (ii) второй домен содержит гетерологичный домен олигомеризации. Дополнительные детали предоставлены выше. Если домен олигомеризации содержит семичленную последовательность (например последовательность из GCN, описанная выше), то предпочтительно его семичленный повтор находится в рамке считывания с последовательностью эктодомена HR2 (если она присутствует).

Также изобретение относится к нуклеиновой кислоте (например ДНК), кодирующей этот полипептид. Также оно относится к векторам, включающим такие нуклеиновые кислоты, и к клеткам-хозяевам, включающим такие векторы. Векторы можно использовать, например, для целей рекомбинантной экспрессии, иммунизации нуклеиновыми кислотами и т.д.

Также изобретение относится к композиции, содержащей молекулы, содержащие эктодомены гликопротеина F RSV, где эктодомены, по меньшей мере, 50% (например, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) молекул присутствуют в конформации "до слияния".

Другие вирусы

Помимо применения для RSV человека, изобретение можно использовать для других представителей *Pneumoviridae* и *Paramyxoviridae*, включая, но не ограничиваясь ими, респираторно-синцитиальный вирус быков, вирус парагриппа 1, вирус парагриппа 2, вирус парагриппа 3 и вирус парагриппа 5.

Таким образом, изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей гликопротеин F из *Pneumoviridae* или *Paramyxoviridae*, где гликопротеин F находится в конформации "до слияния".

Также изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей полипептид, который экспонирует эпитоп, присутствующий в конформации "до слияния" гликопротеина F *Pneumoviridae* или *Paramyxoviridae*, но отсутствует в конформации "после слияния" гликопротеина.

Также изобретение относится к полипептиду, содержащему первый домен и второй домен, где (i) первый домен содержит эктодомен гликопротеина F *Pneumoviridae* или *Paramyxoviridae*, целиком или частично, и (ii) второй домен содержит гетерологичный домен олигомеризации.

Также изобретение относится к этим полипептидам и композициям для применения в иммунизации, и т.д.

Также изобретение относится к композиции, содержащей молекулы, содержащие эктодомены гликопротеина F RSV, где эктодомены, по меньшей мере, 50% (например, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) молекул присутствуют в конформации "до слияния" или в промежуточной конформации.

Полипептиды эктодомена белка F RSV

Применяют конкретные полипептиды эктодомена белка F RSV и они включены в некоторые варианты осуществления изобретения. Некоторые из конкретных полипептидов эктодомена белка F RSV содержат измененные аминокислотные последовательности от приблизительно положения 100 до приблизительно положения 161. Аминокислотные последовательности от положения 100 до положения 150 для нескольких конкретных полипептидов эктодомена белка F RSV представлены на ФИГ. 1С. Аминокислотные последовательности нескольких конкретных полипептидов эктодомена белка F RSV представлены в настоящем документе, например, в примере 1.

Общие положения

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий из" например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или она может включать что-либо дополнительное, например X + Y.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например, композицию, которая "по существу не содержит" Y, может полностью не содержать Y. Когда необходимо, слово "по существу" может быть пропущено в определении в соответствии с изобретением.

Термин "приблизительно" в отношении числового значения x означает, например, $x \pm 10\%$.

Если нет конкретных указаний, процесс, включающий стадию смешивания двух или более компонентов, не требует какого-либо конкретного порядка смешивания. Таким образом, компоненты можно смешивать в любом порядке. Когда имеются три компонента, два компонента можно объединять друг с другом, а затем сочетание можно комбинировать с третьим компонентом, и т.д.

Когда используют материалы животных (и, в частности, крупного рогатого скота) в культуре клеток, они должны быть получены из источников, в которых отсутствуют трансмиссивные губчатые энцефалопатии (TSE), и, в частности, отсутствует губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE). В целом, предпочтительным является культивирование клеток при полном отсутствии материалов из животных.

Когда соединение вводят в организм в качестве части композиции, тогда это соединение можно альтернативно заменять пригодным пролекарством.

Когда используют клеточный субстрат для реассортации или способов возвратной генетики, он предпочтительно представляет собой клеточный субстрат, одобренный для применения при продукции вакцин у человека, например, как в основной главе Ph Eur 5.2.3.

Идентичность между полипептидными последовательностями предпочтительно определяют посредством алгоритма поиска гомологии Smith-Waterman, осуществляемого программой MPSRCH (Oxford Molecular), с использованием аффинного поиска пропусков с параметрами: штраф за внесение делеции=12 и штраф за продолжение делеции=1.

Таблица 1
Фосфолипиды

DDPC	1,2-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DEPA	1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфат
DEPC	1,2-эрукоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DEPE	1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин
DEPG	1,2-диэрукоил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
DLOPC	1,2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DLPA	1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфат
DLPC	1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DLPE	1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин
DLPG	1,2-дилауроил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
DLPS	1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин
DMG	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
DMPA	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфат
DMPС	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DMPE	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин
DMPG	1,2-миристоил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
DMPС	1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин
DOPA	1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфат
DOPC	1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
DOPE	1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин

	DOPG	1,2-диолеил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
	DOPS	1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин
	DPPA	1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфат
	DPPC	1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	DPPE	1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин
5	DPPG	1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
	DPPS	1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин
	DPyPE	1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин
	DSPA	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфат
	DSPC	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	DSPE	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин
10	DSPG	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
	DSPS	1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилсерин
	EPC	яичный PC
	HEPC	гидрогенизированный желточный PC
	HSPC	высоко чистый гидрогенизированный соевый PC
	HSPC	гидрогенизированный соевый PC
15	LYSOPC MYRISTIC	1-миристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	LYSOPC PALMITIC	1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	LYSOPC STEARIC	1-стеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	MPPC	сфингомиелина молока 1-миристоил-1,2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	MSPC	1-миристоил-1,2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	PMPC	1-пальмитоил-1,2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
20	POPC	1-пальмитоил-1,2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	POPE	1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин
	POPG	1,2-диолеил-sn-глицеро-3[фосфатидил-гас-(1-глицерин...)]
	PSPC	1-пальмитоил,2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	SMPC	1-стеароил,2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
	SOPC	1-стеароил,2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин
25	SPPC	1-стеароил,2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - полипептиды F RSV

В этом примере предоставлены последовательности ряда примеров полипептидов (например, которые содержат сигнальные последовательности) и последовательности нуклеиновых кислот, которые можно использовать для экспрессии полипептидов RSV F по настоящему изобретению. Представленные аминокислотные последовательности включают сигнальный пептид и содержат необязательный C-концевой линкер и His-метку (GGSAGSGHNNNNH (SEQ ID NO: 90)). Когда эти полипептиды продуцируются в клетках-хозяевах, полипептид обычно процессируется клеткой для удаления

сигнального пептида и, как описано в настоящем документе, некоторые из полипептидов будут расщепляться по немодифицированным участкам расщепления фурином. Изобретение включает композиции, которые содержат все формы конкретных полипептидов эктодомена белка F RSV, описанных в настоящем документе, включая зрелые формы, которые лишены сигнального пептида, формы, которые могут быть расщеплены на субъединицы, которые содержат F1 и F2, и формы, которые лишены необязательной C-концевой His-метки. Следующие примеры являются только иллюстрирующими объем настоящего изобретения, и, таким образом, не предназначены для ограничения объема никоим образом.

Примером расщепляемого фурином полипептида дикого типа является RSV F wild type Truncated HIS (SEQ ID NO: 84).

Примеры полипептидов, которые можно продуцировать в качестве мономеров, включают: RSV F Furx (SEQ ID NO: 45); RSV F old furx Truncated HIS (SEQ ID NO: 88); RSV F Furx R113Q K123N K124N Truncated HIS (SEQ ID NO: 89); RSV F delp21 furx Truncated

HIS (SEQ ID NO: 47); и RSV F delP23 furx Truncated HIS (SEQ ID NO: 48).

Примеры полипептидов, которые можно получать в качестве тримеров, включают: RSV F N-term Furin Truncated HIS (SEQ ID NO: 85); RSV F Fusion Deletion Truncated HIS (SEQ ID NO: 67) и RSV F Fusion Deletion 2 Truncated HIS (SEQ ID NO: 68).

- 5 Примеры полипептидов, которые можно получать в качестве мономеров или розеткообразных структур тримеров, включают: RSV F furmt Truncated HIS (SEQ ID NO: 50); RSV F furdel Truncated HIS (SEQ ID NO: 51); RSV F delP21 furdel Truncated HIS (SEQ ID NO: 86); и RSV F delP23 furdel Truncated HIS (SEQ ID NO: 49) и RSV F Factor Xa Truncated HIS (SEQ ID NO: 52).
- 10 Примером расщепляемого полипептида дикого типа, который, вероятно, образует розетку, является RSV F C-term Furin Truncated HIS (SEQ ID NO: 87).

full

Следующий полипептид представляет собой полноразмерный полипептид F RSV
1 MELLILKANA ITILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT

15 GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLN KKRKRRLFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKIKSA
LLSTNKAVVS

20 181 LSNQSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS

25 FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK
GEPIINFYDP

30 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO: 21)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше полипептидной последовательности.

35 1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

40 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

45 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

5 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
10 CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

15 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
20 CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
CGAGGTGAAC

25 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
30 CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
CTACGACCCC

35 1441 CTGGTGTTC CAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGCCGGCAAG

1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT
40 CCTGCTGTCT

1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT
GACCCTGTCC

1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG (SEQ
ID NO: 22)

45 **full HIS**

Следующий полипептид включает полноразмерный полипептид F RSV с последующей
гексагистидиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT

GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKIXA
5 LLSTNKAVVS

181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVINKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

241 AGVTTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEEVLAYV

10 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSPLYK
15 GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS

541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGSAG SGHHHHHHH (SEQ ID
NO: 23)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
20 оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
25 CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

30 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
35 CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

40 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
45 CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA

CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
5 CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
10 CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
15 CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
20 CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
25 TGCCGGCAAG

1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT
CCTGCTGTCT

1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT
GACCCTGTCC

1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGCGG
30 CAGCGCCGGC

1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (SEQ ID NO: 24)

full pre HIS

Следующий полипептид включает полноразмерный полипептид F RSV с доменом
35 тримеризации GCN4 (подчеркнут), связанным с С-концом полипептида F RSV, с
последующей гексагистидиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILTA^{VF} CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
40 LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVA^{VS}SKVLHL EGEVNKIKSA
LLSTNKAVVS

181 LSN^{GV}SVLTS KVL^{DL}KNYID KQLLP^{IV}NKQ SCSISNIETV IEFQ^{QK}NNRL
LEITREFSVN

241 AGVTTPVSTY MLT^{NS}ELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQ^{QS}YSIMS
45 IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICL^{TR}TDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSlyVK
GEPIINFYDP

5 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEI
LSKIYHIENE

601 IARIKKLIGE SGGsAGSGHH HHHH (SEQ ID NO: 25)

10 Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

15 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

20 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCCTGAAC

25 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

30 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

35 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

40 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

45 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC

CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
5 CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

10 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
15 TGCCGGCAAG

1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT
CCTGCTGTCT

1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT
GACCCTGTCC

20 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG
CGGCCGGATG

1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT
CGAGAACGAG

1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGGCGGCT CTGCCGGAAG
25 CGGCCACCAC

1861 CACCATCACC ACTGAAG (SEQ ID NO: 26)

full pre HIS 2

Следующий полипептид включает полноразмерный полипептид F RSV с доменом
тримеризации GCN4 (подчеркнут), связанным с С-концом полипептида F RSV, с
30 последующей гексагистидиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

35 121 NAKKTNVTLS KKRKRRLFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA
LLSTNKAVVS

181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL
LEITREFSVN

241 AGVTTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
40 IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

45 421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSPLYVK
GEPINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIIVILLS

541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE

EILSKIYHIE

601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO: 27)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA

CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
5 CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTCC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGCCGGCAAG

10 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT
CCTGCTGTCT

1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT
GACCCTGTCC

1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG
15 CGGCAGCGGC

1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA
CCACATCGAG

1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GGCGAAAGCG GCGGCTCTGC
CGGAAGCGGC

20 1861 CACCACCACC ATCACCCTG AAG (SEQ ID NO: 28)

ecto HIS

Следующий полипептид включает эктодомен полипептида F RSV с последующей
гексагистиридиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
25 GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKRRLFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA
LLSTNKAVVS

30 181 LSNQSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL
LEITREFSVN

241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS
35 FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSlyVK
GEPIINFYDP

40 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNSGG SAGSGHHHHH H (SEQ
ID NO: 29)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
полипептидной последовательности.

45 1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

5 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
10 CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

15 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
20 CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

25 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
30 CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
CGAGGTGAAC

35 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
40 CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
CTACGACCCC

45 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TAGCGGCGGC

1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (SEQ ID NO: 30)

ecto pre HIS

Следующий полипептид включает эктодомен полипептида F RSV с доменом тримеризации GCN4 (подчеркнут), встроенным в полипептид F RSV выше участка, где
5 должен быть ТМ-домен белка RSV (начиная с а.к. 517), с последующей гексагистидиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
10 LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA
LLSTNKAVVS

181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPVINKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

15 241 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
20 GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSlyVK
GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNDKI EEILSKIYHI
ENEIARIKKL

25 541 IGESGGSAGS GHHHHHH (SEQ ID NO: 31)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты является оптимизированной кодирующей последовательностью для указанной выше полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
30 CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

35 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
40 CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

45 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

5 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
10 GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

15 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
20 CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

25 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
30 GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGACAAGATC

1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT
CAAGAAGCTG

35 1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA
CTGAAG (SEQ ID NO: 32)

full pre HA HIS

Следующий полипептид включает полноразмерный полипептид F RSV с доменом
тримеризации "после слияния" из полипептида гемагглютиниона (подчеркнут), связанным
40 с С-концом полипептида F RSV, с последующей гексагистидиновой меткой.

1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKV KLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

45 121 NAKKTNVTLN KKRKR RFLGF LLGVGSAIAS GVA VSKVLHL EGEV N KIKSA
LLSTNKAVVS

181 LSN GVS VLT S KVL DLK NYID KQLLP IVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

241 AGVTTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

5 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK
GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS

10 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KFHQIEKEFS
EVEGRIQDLE

601 KSGGSAGSGH HHHHH (SEQ ID NO: 33)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
15 полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

20 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

25 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

30 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

35 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

40 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

45 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC

CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
5 CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

10 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
15 CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGCCGGCAAG

20 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT
CCTGCTGTCT

1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT
GACCCTGTCC

1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG
25 CGGCAATGAG

1741 AAGTTCCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA
GGACCTGGAA

1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCGG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG
(SEQ ID NO: 34)

ecto pre HA HIS

Следующий полипептид включает эктодомен полипептида F RSV с доменом
тримеризации "после слияния" из полипептида гемагглютиниона вируса гриппа
(подчеркнут), встроенного в полипептид F RSV выше участка, где должен быть TM-
домен белка RSV (начиная с а.к. 517) с последующей гексагистиридиновой меткой.

35 1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKV KLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLS KKRKR RFLGF LLGVGSAIAS GVA VSKVLHL EGEVN KIKSA
40 LLSTNKAVVS

181 LSNGVSVLTS KVL DLKNYID KQLLP IVNKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

241 AGVTTPVSTY MLTNS ELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEEV LAYV

45 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK
GEPINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNEKF HQIEKEFSEV
EGRIQDLEKS

5 541 GGSAGSGHHH HHH (SEQ ID NO: 35)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
10 CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

15 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
20 CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

25 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
30 CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

35 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
40 CACCAGCCCC

961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

45 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

5 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
10 GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGAGAAGTTC

1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT
GGAAAAGAGC

15 1621 GGCGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCCT GAAG (SEQ ID
NO: 36)

full ΔHRB HIS

Следующий полипептид включает полноразмерный полипептид F RSV с удаленным
доменом HRB, с последующей гексагистидиновой меткой.

20 1 MELLILKANA ITTILTA VTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA
25 LLSTNKAVVS

181 LSNQSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL
LEITREFSVN

241 AGVTPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
IIKEVLAYV

30 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK
35 GEPNIMITTI

481 IIVIIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH
(SEQ ID NO: 37)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
40 полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
45 CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCTGAAC

5 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
10 CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

15 661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
20 CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

25 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
30 CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

35 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA ATATCATGAT
40 CACCACAATC

1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT
GCTGTACTGC

1501 AAGGCCCCGA GCACCCCTGT GACCCTGTCC AAGGACCAGC TGTCCGGCAT
CAACAATATC

45 1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG (SEQ
ID NO: 38)

ecto

Следующий полипептид включает только эктодомен полипептида F RSV.

1 MELLILKANA ITTILTA/TF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE

61 LSNIKENKCN GTDAKVLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE
LPRFMNYTLN

5 121 NAKKTNVTLS KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA
LLSTNKAVVS

181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL
LEITREFSVN

241 AGVTTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS
10 IIKEEVLAYV

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT

15 421 KCTASNKNRG IKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSPLYK
GEPIINFYDP

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (SEQ ID NO: 39)

Следующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой
оптимизированную кодирующую последовательность для указанной выше
20 полипептидной последовательности.

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC
CGTGACCTTC

61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG
CAGCGCCGTG

25 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT
CACCATCGAG

181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA
ACTGATCAAG

241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT
30 GCAGAGCACC

301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA
CACCCTGAAC

361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT
CCTGGGCTTC

35 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT
GCTGCACCTG

481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC
CGTGGTGTCC

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA
40 CTACATCGAC

601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT
CGAGACCGTG

661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT
CAGCGTGAAC

45 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT
GCTGTCCCTG

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA
CGTGCAGATC

841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT
GGCCTACGTG

901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA
CACCAGCCCC

5 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC
CGACCGGGGC

1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC
CTGCAAGGTG

1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC
10 CGAGGTGAAC

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC
CTCCAAGACC

1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGGCCATCG TGAGCTGCTA
CGGCAAGACC

15 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA
CGGCTGCGAC

1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA
CTACGTGAAT

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT
20 CTACGACCCC

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA
GAAGATCAAC

1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA
TGCCGGCAAG

25 1561 AGCACCACCA ATTGAAG (SEQ ID NO: 40)

RSV F Full Length

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
30 VVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
35 YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITTHIIVILLSL
IAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN (SEQ ID NO: 41)

RSV F Cleavage Enterokinase idealized

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
40 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
VVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
45 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSEDFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNNGSGSGDDDDDKGSG
SGIMITTHIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN (SEQ ID NO: 42)

RSV F Cleavage Thrombin idealized

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 5 NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
 YDPLVFPSEDFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGLVPRGSGSGI
 10 MITTHIVHIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 43)

RSV F Cleavage FactorXa idealized

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
 15 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
 20 YDPLVFPSEDFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNINAGKSTTNGSGSGIEGRGSGSGIM
 ITTHIVHIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 44)

RSV F furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYT
 25 LNNAKKTNVTLSQNNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 30 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIIN
 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 45)

RSV F furx R113Q, K123N, K124N Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 35 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
 LNNANNTNVTLNQNQNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 40 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIIN
 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 46)

RSV F furx R113Q, K123Q, K124Q Truncated HIS

45 MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
 LNNAAQTNVTLSQNNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS

VNAGVTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
GKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIIN
5 FYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
HH (SEQ ID NO: 93)

RSV F delP21 furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
10 ----- QNQNFLLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
VLTskVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPV
STYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYG
VIDTPCWLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
15 KNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO: 47) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении удалена)

RSV F delP23 furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
20 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
----- QNQNFLLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
VLTskVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVST
YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVI
DTPCWLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
25 DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
NRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:
48) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении удалена)

RSV F delP23 furdel Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
30 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ -----
----- QQQRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
VLTskVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVST
YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVI
35 DTPCWLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
NRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:
49) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении удалена)

RSV F furmt Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELPRFMNYT
LNNAKKTNVTLSSKKRKKKFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTskVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
45 VNAGVTPPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
GKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIIN

FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH
HH (SEQ ID NO: 50)

RSV F furdel Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAV/SGGYLSALRTGWYTSVITIE
5 L SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQELPRFMNYT
L NNAKKTNTVTLSSKK --- RFLGFLLGVGSAIASGVA/AVSKVLHLEGEV/NKIKSALLSTNKA
V VVSLNGVSVLT/SKVLDLKNYIDKQLLPIV/NKQSCSISNIETVIEFQQKNNR/LLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
V VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYKDHAGSVSFFPQAETC
10 K VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV/NKQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH
(SEQ ID NO: 51) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом положении
удалена)

RSV F Factor Xa Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAV/SGGYLSALRTGWYTSVITIE
L SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELPRFMNYTL
N NNAKKTNTVTLSSKKIEGRFLGFLLGVGSAIASGVA/AVSKVLHLEGEV/NKIKSALLSTNKA
V VVSLNGVSVLT/SKVLDLKNYIDKQLLPIV/NKQSCSISNIETVIEFQQKNNR/LLEITREFSVN
20 A GVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
V VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCK
V VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGK
TKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV/NKQEGKSLYVKGEPIINFY
DPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH
25 (SEQ ID NO: 52)

RSV F Short linker Foldon HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAV/SGGYLSALRTGWYTSVITIE
L SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
L NNAKKTNTVTLSSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVA/AVSKVLHLEGEV/NKIKSALLSTNKA
30 V VVSLNGVSVLT/SKVLDLKNYIDKQLLPIV/NKQSCSISNIETVIEFQQKNNR/LLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
V VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
K VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV/NKQEGKSLYVKGEPIINF
35 YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGSGYIPEAPRDGQ
AYVRKDGEWVLLSTFLGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO: 53)

RSV F Long linker Foldon HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAV/SGGYLSALRTGWYTSVITIE
L SNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
40 L NNAKKTNTVTLSSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVA/AVSKVLHLEGEV/NKIKSALLSTNKA
V VVSLNGVSVLT/SKVLDLKNYIDKQLLPIV/NKQSCSISNIETVIEFQQKNNR/LLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
V VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
K VQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
45 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV/NKQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNNKNDDKSGSYIPE
APRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO: 54)

RSV_F_ecto_pre_his

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 5 NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
 YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL
 10 IGESGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO: 55)

ECTO PRE HA HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
 15 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINF
 20 YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLE
 KSGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO: 56)

RSV F ECTO Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
 25 LNNANNTNVTLSQNNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 30 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIIN
 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKK
 LIGESGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO: 57)

RSV F ECTO delp21 GCN HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 35 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
 ----- QNNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVS
 VLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPV
 STYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYG
 VIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
 40 CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
 KNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
 SEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGS
 A GSGHHHHH (SEQ ID NO: 58) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом
 положении удалена)

RSV F ECTO delp23 Furx GCN HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
 ----- QNNQNNFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV

LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVST
YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVI
DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
5 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAG
SGHHHHHH (SEQ ID NO: 59) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом
положении удалена)

RSV F ECTO delp23 Furdel GCN HIS

10 MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ -----
----- QQQRFLGFLGFGVSAIASGVA/SKVLHLEGEVNBKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVST
YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVI
15 DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPD
EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN DKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGESGGSAG
SGHHHHHH (SEQ ID NO: 60) (символ "-" указывает на то, что аминокислота в этом
положении удалена)

RSV F Full Length Furx

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
LNNANNTNVTLNQNNQNLGFLGFGVSAIASGVA/SKVLHLEGEVNBKIKSALLSTNK
25 AVVSLSNGVSVLTTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
VNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
GKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLEYVKGEPIIN
30 FYDPLVFPDDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN AGKSTTNIMITTHIIVIVILLS
LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 61)

RSV F Full Length delp21

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
35 ----- QNQNNQNLGFLGFGVSAIASGVA/SKVLHLEGEVNBKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
VLTTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPV
STYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYG
VIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYKDHKGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
40 KNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPD
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN AGKSTTNIMITTHIIVIVILLSLIAVGLLLY
CKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 62) (символ "-" указывает на то, что
аминокислота в этом положении удалена)

RSV F Full Length p23 Furx GCN HIS

45 MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN -----
----- QNQNNQNLGFLGFGVSAIASGVA/SKVLHLEGEVNBKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVST

YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVI
 DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
 DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
 5 EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN AGKSTTNIMITTHIIVIIIVILLSLIAVGLLLYC
 KARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 63) (символ "-" указывает на то, что
 аминокислота в этом положении удалена)

RSV F Full Length p23 Furdel GCN HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 10 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ -----
 ----- QQQRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNKA VVSLSNGVSV
 LTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVST
 YMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVI
 DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
 15 DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
 NRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
 EFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVN AGKSTTNIMITTHIIVIIIVILLSLIAVGLLLYC
 KARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 64) (символ "-" указывает на то, что
 аминокислота в этом положении удалена)

RSV F N-термин Furin Furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
 LNNAQQTNVTLSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNKA
 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSV
 25 NAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 KTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINF
 YDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNNGGSAGSGHHHHHH
 30 (SEQ ID NO: 65)

RSV F C-term Furin Furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAQQTNVTLSQNNQNNFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNK
 35 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFS
 VNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 GKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIIN
 40 FYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 66)

RSV F Fusion Deletion 1 Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 45 LNNAKKTNTVTLSKKRKRRAIASGVAVSKVLHLEGEVNNIKSALLSTNKA VVSLSNGV
 SVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPV
 STYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYG
 VIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF

CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
KNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID
NO: 67)

5 **RSV F Fusion Deletion 2 Truncated HIS**

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
LNNAKKTNVTLSKKRKRGRGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSL
NGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGV
10 TTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQL
PLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQS
NRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKC
TASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPL
VFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHH (SEQ
15 ID NO: 68)

RSV F Furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
LNNAAQQTNTVTLNQNNQNFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
20 AVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
VNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
GKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIIN
25 FYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
HH (SEQ ID NO: 69)

RSV F Furx Truncated

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
30 LNNAAQQTNTVTLNQNNQNFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
VNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
35 GKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIIN
FYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO: 70)

RSV F delP23 furdel Truncated No HIS (для клеток CHO)

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ -----
40 ----- QQQRFLGFLGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVST
YMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVI
DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC
DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
45 NRGIIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO: 71) (символ "-"
указывает на то, что аминокислота в этом положении удалена)

RSV F (Wt) Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYT
 LNNAKKTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKA
 VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSV
 5 NAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
 VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
 KTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIINF
 YDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHH
 10 (SEQ ID NO: 84)

RSV F old furx Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNY
 TLNNANNTNVTLNQNNQNFGLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 15 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIIN
 20 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 88)

RSV F Furx R113Q K123N K124N Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
 25 LNNAAQQTNTVTLNQNNQNFGLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 30 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIIN
 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 89)

RSV F N-term Furin Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 35 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELQPFMNYT
 LNNAAQQTNTVTLNQNNQNFGLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNK
 AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFS
 VNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLA
 YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAET
 40 CKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCY
 GKTCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQEGKSLYVKGEPIIN
 FYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHH
 HH (SEQ ID NO: 85)

RSV F delP21 furdel Truncated HIS

45 MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSA/SGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ -----
 ---- QNQQQRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVS
 VLTskVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPV

STYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYG
VIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASN
KNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPS
5 DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID
NO: 86)

RSV F C-term Furin Truncated HIS

MELLILKANAITTILTA/TFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYT
10 LNNAQQTNVTLSKKRKRRLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKA
VVSLSNGVSVLTSLKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSV
NAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAY
VVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYG
15 KTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINF
YDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH
(SEQ ID NO: 87)

Пример 2 - экспрессия и очистка конструкций F RSV

Конструкции F RSV ECTO и укороченные конструкции F RSV, лишенные

20 трансмембранного домена и цитоплазматического концевой участка либо с участками
расщепления фурином дикого типа, либо несущие мутации с нокаутом участков
расщепления фурином и со стабилизирующими конформацию "до слияния" мутациями,
клонировали в бакуловирусный экспрессирующий вектор pFastBac (Invitrogen). Несколько
из этих конструкций содержат С-концевой гибкий линкер, за которым следует
25 последовательность His6-метки, использованная для хелатирующей очистки. Исходные
бакуловирусные культуры для продукции пассировали в клетках насекомых Sf9. Белки
экспрессировали путем инфицирования клеток насекомых Sf9, Tn5 или High Five
требуемым количеством бакуловируса и сбора супернатанта среды двое или трое суток
после инфицирования, осуществляя мониторинг вестерн-блоттингом с использованием
30 антитела против F RSV или антитела против 6HIS.

Экспрессирующую среду в большом масштабе концентрировали/очищали с помощью
одной из двух общих стратегий устранения неблагоприятного эффекта ферритина,
присутствующего в среде клеток насекомых, который может разрушать хелатирующую
смолу. Первым подходом было концентрирование приблизительно 10-20 литров среды
35 для экспрессии в клетках насекомых до приблизительно 300 мл с использованием
колонки для концентрирования на волокне GE Healthcare Hollotube. К этой
концентрированной смеси добавляли сульфат меди до конечной концентрации 500 мкМ
и полученный раствор наносили на 5-мл хелатирующие колонки HiTrap. Затем с колонки
элюировали связанный HIS-меченый белок с помощью 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl
40 и градиента имидазола.

Во второй стратегии очистки к супернатанту среды добавляли CuCl_2 до конечной
концентрации 500 мкМ. К каждому 1 литру среды добавляли четыре миллилитра
хелатирующей смолы (Chelating Resin, BioRad) и взвесь качали в течение, по меньшей
мере, тридцати минут при 4 градусах Цельсия и смолу и среду разделяли с помощью
45 гравитационной колонки. Смолу промывали десятью объемами колонки буфера для
уравновешивания (25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl) и белок F элюировали десятью
объемами колонки буфера для элюирования (буфер для уравновешивания с 250 mM
имидазолом). Элюат подвергали диализу против 25 mM Tris-буфера, pH 7,5, и

полученный раствор наносили на 5-мл хелатирующую колонку Hitrap, заполненную NiSO_4 , и элюировали 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl и градиентом имидазола.

Элюаты после градиента имидазола в любом случае оценивали с использованием вестерн-блоттинга с антителом против 6HIS и гелей с кумасси синим. Фракции, содержащие чистые конструкции, собирали, подвергали диализу против различных растворов буфер/солевой раствор и концентрировали для последующего анализа с использованием Millipore Centriprep Concentrators и/или элементов для концентрирования Vivaspin. Также авторы изобретения разработали протокол очистки эксклюзионной хроматографии, способной далее очищать монодисперсные тримеры RSV от розеткообразных структур (ниже).

SEC-анализ белков F RSV:

Документально подтвержденным признаком других слитых белков парамиксовирусов, стабилизированных в их конформации "до слияния", является то, что даже после расщепления с экспонированием пептида слияния они не образуют розеткообразные структуры, как наблюдают для конформации "после слияния". Простой анализ эксклюзионной хроматографией позволяет идентификацию белка и определение того, образует ли белок розеткообразные структуры. Были разработаны два способа, ВЭЖХ-SEC и FPLC-SEC, которые также служат в качестве эффективной стадии очистки.

ВЭЖХ-SEC проводили с использованием колонки Biorad SEC (18 мм) с подвижной фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием стандартов Biorad ВЭЖХ-SEC для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV (соответствующие расщепленным конформациям "после слияния") элюируются в свободном объеме колонки в анализе, в то время как монодисперсные тримеры RSV (предположительно тримеры из последующего ЕМ-анализа) элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 100 кДа.

FPLC-SEC проводили на GE Healthcare FPLC с использованием колонке 16/60 Superdex 200 с подвижной фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием высокомолекулярных стандартов GE Healthcare для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV элюируются в свободном объеме в анализе, в то время как монодисперсные тримеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 100 кДа.

Электронная микроскопия (ЕМ) белков F RSV

Растворы белка конструкций F RSV приблизительно 50 микрограмм на мл абсорбировали на покрытую углеродом решетку с тлеющим зарядом и негативно контрастировали 2% фосфовольфраматом натрия (pH 7,0) или 0,75% уринал-формиадом (не определенное количественно низкое значение pH). Решетки наблюдали на трансмиссионном электронном микроскопе Technai Spirit или JOEL 1230, действующем в диапазоне 80-120 кВ с увеличением от 20000 до 150000, в зависимости от требуемого разрешения.

Таблица 2	
Конструкция	Подтверждение с помощью ЕМ
RSV F ECTO HIS	Преимущественно розеткообразные структуры
RSV F Furdel ECTO (расщепленный)	Преимущественно розеткообразные структуры
RSV F Delp23 Furdel Truncated (нерасщепленный)	Наблюдались тримеры
RSV F Fusion Peptide Deletion 1 Truncated (нерасщепленный)	Тримеры
RSV F Delp23 Furdel Truncated (расщепленный трипсином после очистки)	Преимущественно розеткообразные структуры с небольшим количеством тримеров
RSV F Delp23 Furdel Truncated (расщепленный трипсином после очистки в присутствии наноллипидного диска)	Асимметричные розеткообразные структуры с кажущимся наноллипидным диском в центре розеткообразной структуры

Пример 3 - Детекция F RSV "до слияния" и "после слияния"

Для определения конформации белка F RSV для анализа того, является ли неблагоприятной конформация "после слияния" в белке F RSV доступен ряд способов. Примеры включают ассоциацию с липосомами, специфичные к конформации
 5 моноклональные антитела (включая антитела, которые используют в FACS, ELISA, и т.д.), электронную микроскопию, дифференциальную чувствительность к протеазам между конформациями, гель-фильтрацию, аналитическое ультрацентрифугирование, динамическое рассеяние света, эксперименты по ЯМР с заменой дейтерием, масс-спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма, изотермическую титрационную
 10 калориметрию, спектроскопию с триптофаном и рентгеновскую кристаллографию.

Ассоциация с липосомами

Ассоциацию с липосомами можно использовать для анализа конформации белка F RSV. Растворимые формы белка F RSV в конформации "до слияния" не ассоциируют с липосомами, в то время как конформация "после слияния" ассоциирует с липосомами.

15 Липосомы можно получать следующим образом: 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин и холестерин в хлороформе (доступный от Avanti Polar Lipids) смешивают в молярном соотношении 8:2:5. Хлороформ упаривают в атмосфере аргона. Образуется липидная пленка, которую сушат в вакууме в течение ночи и ресуспендируют в PBS с общей концентрацией липидов
 20 40 мМ. После пяти циклов замораживания-размораживания липиды встряхивают и экстрадируют 21 раз через два 100-мкм фильтра с использованием миниэкструдера (доступного от Avanti Polar Lipids).

После получения липосом можно проводить анализ ассоциации липосом. Для каждого тестируемого образца 2 мкг полипептида F RSV для тестирования расщепляют 25
 25 миллиединицами трипсина (доступен от Worthington Biochemical) в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7,1) в течение 30 мин при 25°C. После расщепления в каждый образец добавляют 40 пг ингибитора трипсина сои (доступный от Worthington Biochemical) для завершения реакции. Образцы предварительно обрабатывают при 60°C в течение 30 мин, что индуцирует конформационный сдвиг с формы "до слияния" на форму "после
 30 слияния" в нативном выделенном белке RSF F. Добавляют липосомы (40 мкл на образец) и PBS (конечный объем 80 мкл), и образцы инкубируют при 60°C в течение 30 мин. Добавляют сахарозу до конечной концентрации 50% (конечный объем 500 мкл). На образцы наслаивают 500 мкл каждого из 40% сахарозы, 25% сахарозы и PBS и центрифугируют их в роторе TLS55 при 49000 об./мин. в течение 3 ч при 25°C. Фракции
 35 (500 мкл) собирают сверху градиентов. Белки солибилизируют в 0,5% Triton X-100 и осаждают с использованием 12,5% об./об. трихлоруксусной кислоты. Полипептиды разделяют посредством SDS/PAGE и переносят на мембраны PVDF. Блоты исследуют с помощью моноклональных антител против F RSV.

Электронная микроскопия

40 Электронную микроскопию исследовали для анализа распределения конформаций полипептидов F RSV. Полипептиды F RSV в форме до слияния имеют форму "шара и стержня" длиной ~12 нм. Напротив, полипептиды F RSV в форме "после слияния" имеют форму "метки для мяча в гольфе" с длиной ~16 нм. Дополнительно пептиды слияния на узком конце "метки для мяча в гольфе" агрегируют с образованием структур
 45 розеткообразных структур. Таким образом, электронную микроскопию можно применять для анализа распределения конформаций в образце полипептидов F RSV благодаря легко различимым формам.

Пример 4 - Тримеры и розеткообразные структуры эктодомена F RSV

Конструкции эктодомена белка F RSV, кодирующие полипептиды, которые лишены трансмембранного домена и цитоплазматического концевой участка либо с участками расщепления фурином дикого типа, либо несущие мутации с нокаутом участков расщепления фурином и/или мутации пептида слияния, клонировали в бакуловирусный экспрессирующий вектор pFastBac (Invitrogen). Несколько из этих конструкций содержат С-концевой гибкий линкер, за которым следует последовательность HIS₆-метки, использованная для хелатирующей очистки. Исходные бакуловирусные культуры для продукции пассировали в клетках насекомых Sf9. Белки экспрессировали путем инфицирования клеток насекомых Sf9, Tn5 или High Five требуемым количеством бакуловируса и сбора супернатанта среды двое или трое суток после инфицирования. Мониторинг продукции белка вестерн-блоттингом проводили с использованием антитела против F RSV или антитела против HIS₆.

Экспрессирующую среду в большом масштабе концентрировали/очищали с помощью одной из двух общих стратегий устранения неблагоприятного эффекта ферритина, присутствующего в среде клеток насекомых, который может разрушать хелатирующую смолу. Первым подходом было концентрирование приблизительно 10-20 литров среды для экспрессии в клетках насекомых до приблизительно 300 мл с использованием колонки для концентрирования на волокне GE Healthcare Hollotube. К этой концентрированной смеси добавляли сульфат меди до конечной концентрации 500 мкМ и полученный раствор наносили на 5-мл хелатирующие колонки HiTrap. Затем с колонки элюировали связанный HIS-меченый с помощью 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl и градиента имидазола.

Во второй стратегии очистки к супернатанту среды добавляли CuCl₂ до конечной концентрации 500 мкМ. К каждому 1 литру среды добавляли четыре миллилитра хелатирующей смолы (Chelating Resin, BioRad) и взвесь качали в течение, по меньшей мере, тридцати минут при 4 градусах Цельсия и смолу и среду разделяли с помощью гравитационной колонки. Смолу промывали десятью объемами колонки буфера для уравнивания (25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl) и белок F элюировали десятью объемами колонки буфера для элюирования (буфер для уравнивания с 250 mM имидазолом). Элюат подвергали диализу против 25 mM Tris-буфера, pH 7,5, и полученный раствор наносили на 5-мл хелатирующую колонку Nitrap, заполненную NiSO₄, и элюировали 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl и градиентом имидазола.

Элюаты после градиента имидазола в каждом случае оценивали с использованием вестерн-блотов против HIS₆ и/или окрашенных кумасси синим гелей для SDS-PAGE. Фракции, содержавшие чистые конструкции, собирали, подвергали диализу с помощью различных растворов буфер/физиологический раствор и концентрировали для последующего анализа с использованием концентратов Millipore Centriprep и/или элементов для концентрирования Vivaspin. В некоторых случаях мономеры, тримеры или розеткообразные структуры далее очищали с использованием эксклюзионной хроматографии.

SEC-анализ и очистка эктодоменов F RSV

Эксклюзионную хроматографию использовали для очистки и анализа мономеров, тримеров и розеткообразных структур эктодомена белка F RSV. Этот способ также позволяет очистку нерасщепленных эктодоменов белка F RSV от клеток-хозяев или примесей липидов и липопротеинов из среды. Было разработано два способа, ВЭЖХ-SEC и FPLC-SEC, которые также могут служить в качестве эффективной стадии очистки.

ВЭЖХ-SEC проводили с использованием колонки Biorad SEC (18 мм) с подвижной

фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием стандартов Biorad ВЭЖХ-SEC для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV (соответствующие расщепленным конформациям "после слияния") элюируются в свободном объеме колонки в анализе, в то время как мономеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 75-85 кДа.

FPLC-SEC проводили на GE Healthcare FPLC с использованием колонки 16/60 Superdex 200 с подвижной фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием высокомолекулярных стандартов GE Healthcare для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV элюируются в свободном объеме в анализе, в то время как монодисперсные тримеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 140-160 кДа и мономеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой 75-85 кДа.

Для очистки использовали способ FPLC-SEC и собирали фракции объемом 1 мл.

Расщепление трипсином конструкций Furdel или Delp23 Furdel с образованием розеткообразных структур "после слияния"

Как правило, расщепление трипсином мономеров Delp23 Furdel проводят в соотношении 1:1000 трипсин:F RSV по массе, или 10-15 единиц BAEE трипсина на 1 мг антигена F RSV. В типичной реакции трипсин из плазмы быка (Sigma Aldrich, T8802: 10000-15000 BAEE единиц/мг трипсина) разбавляли до концентрации 1 мг/мл в 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. Раствор полипептида эктодомена белка F RSV в концентрации 1 мг/мл (разбавленный в 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl) обрабатывали одним микролитром раствора трипсина (конечное соотношение масс 0,001:1 трипсин:F RSV или приблизительно 10-15 единиц BAEE трипсина на каждый миллиграмм F RSV) в течение 1 часа при 37°C. Как правило, мониторинг хода реакции проводили с помощью геля SDS-PAGE. Реакцию расщепления останавливали с использованием ингибитора трипсина. Расщепленный белок F RSV далее очищали эксклюзионной хроматографией.

Иногда к расщепленному раствору добавляли объем 1:100 иммобилизованного ингибитора трипсина (Sigma) или 1 микролитр 1 mM ингибитора трипсина сои и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 15-30 минут при осторожном качании для остановки реакции трипсина. Ингибирующую смолу отделяли от раствора белка с использованием микроцентрифужных колонок. Полученный раствор очищали с помощью SEC.

Электронная микроскопия (ЕМ) белков F RSV

Полипептиды эктодомена белка F RSV (приблизительно 50 микрограмм на мл) абсорбировали на покрытую углеродом решетку с тлеющим зарядом и негативно контрастировали 2% фосфовольфраматом натрия (pH 7,0) или 0,75% уринал-формиатом (не определенное количественно низкое значение pH). Решетки наблюдали на трансмиссионном электронном микроскопе Technai Spirit или JOEL 1230, действующем в диапазоне 80-120 кВ с увеличением от 20000 до 150000, в зависимости от требуемого разрешения.

Анализ фосфолипидов

Анализ основан на способе анализа Wako Pure Chemical Industries, Ltd. с холиноксидазой фосфолипидов C - DAOS (Номер по каталогу 433-36201). Протокол анализа модифицирован только для снижения количества материала, использованного в анализе, и для снижения разведения образца в реакционной смеси относительно общего протокола поставщика. Для определения содержания липидов в образце F RSV, получали цветной реагент путем растворения одной бутылки цветного реагента одной бутылкой буфера (цветной реагент является стабильным в течение 1 недели при 4°C). Стандарт

фосфолипида в концентрации 300 мг/дл (3 мг/мл) разбавляли до 1,5, 1,0, 0,75, 0,5 и 0,25 мг/мл дистиллированной водой. Для каждого стандарта, пустого образца с водой и образца реакционной смеси в микроцентрифужную пробирку добавляли 10 мкл цветного реагента и 2 мкл стандарта, дистиллированной воды (стандарт 0 мг/мл) или образца.

5 Реакционные смеси кратковременно центрифугировали для обеспечения надлежащего перемешивания и пробирки инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Для каждой точки стандарта регистрировали поглощение при 595 нм и строили стандартную кривую. Для каждого образца регистрировали поглощение при 595 нм и из полученной калибровочной кривой вычисляли концентрацию фосфолипидов.

10 Иммуногенность у хлопковых хомячков

Иммуногенность полипептидов эктодомена белка F RSV в формах мономеров (нерасщепленная delp21 furx), розеткообразных структур тримеров (расщепленная delp23 furdel), и тримеров (делеция пептида слияния) определяли у хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*) в двух исследованиях. В исследовании 1 (ФИГ. 8А и 8В), 10 хлопковых хомячков на группу вакцинировали внутримышечно 10 мкг мономеров или розеткообразных структур (все из них адсорбированные на гидроксиде алюминия) на 0 и 21 сутки. Титры сывороточных IgG против F RSV и нейтрализующих антител против RSV измеряли через 2 недели после 1-ой вакцинации (2wp1) и 2 недели после 2-ой вакцинации (2wp2), или 3 недели после 1-ой вакцинации (3wp1) и 2 недели после 2-ой вакцинации (2wp2). IgG против белка F RSV (ФИГ. 8А) определяли с помощью ELISA с использованием покрытых белком F RSV планшетов и конъюгированного с пероксидазой хрена детектирующего антитела курицы против IgG хлопкового хомячка. Данные представлены в качестве $\log_{10}$ геометрических средних значений титров (GMT) + стандартное отклонение у отдельных хлопковых хомячков. Титры нейтрализации RSV (ФИГ. 8В) измеряли с помощью теста нейтрализации в виде уменьшения бляшек (PRNT). В кратком изложении разведения инактивированной нагреванием сыворотки предварительно инкубировали с RSV Long, а затем инокулировали на клетки HEp-2 в чашки с 12-ячейками. После инфицирования в течение 2 часов инокулят удаляли и на клетки наслаивали агарозу. Бляшки количественно определяли через 5 суток после окрашивания нейтральным красным. Титр нейтрализации определяют как обратную величину разведения сыворотки, дающую, по меньшей мере, 60% снижение количества бляшек на лунку относительно контролей (без сыворотки). Данные представлены в качестве $\log_{10}$ GMT + стандартная ошибка для 2 объединенных групп по 5 хлопковых хомячков на группу.

35 В исследовании 2 (ФИГ. 8С), 9 хлопковых хомячков на группу иммунизировали внутримышечно указанными дозами мономеров, тримеров или розеткообразных структур (каждый из них адсорбирован на гидроксид алюминия). Сывороточные титры IgG против F RSV измеряли 2wp1 как указано выше.

40 Результаты

Растворимый эктодомен F RSV (с немутантными участками расщепления фурином) экспрессировали, но его нельзя было очистить от примесей липидов и липопротеинов из клеток-хозяев или культуральной среды с использованием эксклюзионной хроматографии. Эти полипептиды эктодомена F RSV элюируются в свободном объеме колонки SEC вместе с примесями липидов и липопротеинов.

45 Для получения полипептидов эктодомена F RSV было получено несколько конструкций, которые содержат мутации в участках расщепления фурином, включая конструкции Furdel. См. ФИГ. 1. Полипептиды, полученные экспрессией конструкций Furdel секретируются из клеток в качестве нерасщепленных структур массой ~65 кДа.

Мутация Furdel также препятствует экспонированию пептида слияния, что, в свою очередь, препятствует образованию розеткообразных структур. В результате растворимый F RSV Furdel мигрировал во внутреннем объеме препаративной колонки Superdex 200, что приводило к отделению как от липидного дебриса, который элюировался в свободном объеме, и так и от примесей белков насекомых. Эти результаты демонстрируют, что полипептиды эктодомена F RSV, в которых участки расщепления фурином являются мутантными, получают в качестве нарасщепленного полипептида, который можно очищать с помощью SEC. Дополнительно анализ времени удержания нерасщепленного F RSV согласовывался с тем, что полипептиды являлись

мономерами, а не тримерами. То, являлись ли полипептиды F RSV furdel мономерами, тримерами или смесью мономеров и тримеров, оценивали далее с использованием аналитического ультрацентрифугирования. Исследования по аналитическому ультрацентрифугированию проводили с использованием белка, очищенного из пика мономера при очистке с помощью SEC. Данные о скорости оседания нерасщепленного F RSV показали ступенчатый паттерн, указывая на две структуры в растворе. Анализ скорости оседания показал, что нерасщепленный эктодомен F RSV имел высокую долю мономера и небольшую долю предполагаемого тримера в растворе. Данные о равновесии собирали и предпринимали попытки для сопоставления данных либо с идеальной моделью мономера, либо с равновесной моделью мономер-тример. Однако разность при сопоставлении была низкой, особенно у дна ячейки, где концентрация белка является более высокой. Эти наблюдения указывают на то, что нерасщепленные полипептиды эктодомена F RSV, главным образом, представляют собой мономер с меньшей совокупностью собственных ассоциированных структур (возможно, тримеров) или агрегатов при более высоких концентрациях.

Дальнейший анализ выбранных полипептидов эктодомена белка F RSV проводили с использованием эксклюзионной (SEC) хроматографии. ФИГ. 6А-6D. Основные пики, содержащие мономеры, тримеры или розеткообразные структуры тримеров, указаны звездочкой на ФИГ. 6А-6D, причем время удержания на колонке Superdex P200 16/60 (GE Healthcare) указано в миллилитрах. На калиброванной колонке приблизительное время удержания 47 млс, 65 млс и 77 млс соответствует сводному объему колонки, времени удержания тримеров F и времени удержания мономеров, соответственно. На ФИГ. 6А нерасщепленную конструкцию Delp23 Furdel ($\Delta p23$ Furdel) очищали из пика мономера. Когда нерасщепленный антиген Delp23 Furdel F RSV обрабатывали трипсином, белок образовывал розеткообразные структуры, которые мигрировали на SEC в свободном объеме (ФИГ. 6В). Расщепленные структуры тримеров F RSV с делением пептида слияния очищали из пика тримера при времени удержания приблизительно 65 млс (ФИГ. 6С) в то время как нерасщепленную конструкцию Delp21 Furx ($\Delta p21$ Furx) очищали из пика мономера приблизительно при 77 млс (ФИГ. 6D).

Несколько полипептидов эктодомена белка F RSV в нерасщепленной форме или после расщепления трипсином оценивали с помощью ЕМ. Конструкции F RSV Furdel и delp23 Furdel имеют остатки аргинина, сохраненные в участке расщепления фурином. Эти остатки аргинина являются чувствительными к расщеплению трипсином. При расщеплении нерасщепленные структуры F_0 превращались в структуры F_1/F_2 , в которых пептид слияния экспонирован. ЕМ-анализ подтвердил, что после расщепления трипсином нерасщепленные эктодомены RSV образовывали розеткообразные структуры тримеров через пептиды слияния, как наблюдали для сходных слитых белков. Результаты представлены в таблице 3, и показывают, что нерасщепленные полипептиды эктодомена

белка F RSV можно расщеплять с образованием розеткообразных структур тримеров. Конструкция с удаленным пептидом слияния, которая расщепляется фурином, образовывала монодисперсные тримеры. Также см. ФИГ. 7A-7D. Преимущественно, образование розеткообразных структур тримеров этим путем приводит к розеткам тримеров, которые по существу свободны от липидного дебриса и липопротеинов.

Результаты исследований иммуногенности показали, что полипептиды эктодомена белка F RSV в форме мономеров (нерасщепленный delp21 furx), розеткообразных структур тримеров (расщепленный delp23 furdel) и тримеров (делеция пептида слияния) были иммуногенными у хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*) и индуцировали нейтрализующие антитела. ФИГ. 8A-8C.

Таблица 3	
Конструкция	Конформация при ЕМ
Эктодомен F RSV дикого типа (расщепленный в клетке-хозяина в ходе экспрессии)	Розеткообразные структуры тримеров, ассоциированные с липидным дебрисом
Расщепляемый трипсином Furdel (очищенный пик мономера - не расщепленный)	Переменная. Некоторые препараты демонстрируют монодисперсные тримеры; другие демонстрируют немного материала, видимый при ЕМ негативно контрастированного материала
Расщепляемый трипсином Furdel (очищенный пик мономера - расщепленный трипсином после очистки)	Розеткообразные структуры тримеров
Расщепляемый трипсином delp23 furdel (очищенный пик мономера - нерасщепленный)	Переменная. Некоторые препараты демонстрируют монодисперсные тримеры; другие демонстрируют немного материала, видимый при ЕМ негативно контрастированного материала
Расщепляемый трипсином delp23 Furdel (очищенный пик мономера - расщепленный трипсином после очистки)	Розеткообразные структуры тримеров
Расщепленный с делецией пептида слияния (очищенный пик мономера)	Монодисперсные тримеры

Пример 5 - Способы получения антигенов субъединиц F RSV в клетках насекомых или CHO

Очистка антигена F RSV из клеток насекомых

Субъединицы эктодомена F RSV, включающие Delp21 Furx, Delp23 Furdel и конструкции с делецией пептида слияния, экспрессировали в клетках насекомых HiFive (Invitrogen) с использованием бакуловирусной системы pFAST Bac. Субъединицу F RSV после крупномасштабной экспрессии, 10-25 литров, с помощью двухстадийного хелатирующего способа, который снижает вредоносный эффект примесей ферритина, присутствующих в среде клеток насекомых, который может разрушать хелатирующую смолу. К суперанту среды добавляли CuSO_4 до конечной концентрации 500 мкМ. На каждый 1 литр среды добавляли приблизительно от десяти до двадцати миллилитров хелатирующей смолы (Chelating Resin, BioRad), взвесь качали в течение, по меньшей мере, тридцати минут при 4°C, и смолу и среду разделяли с использованием гравитационной колонки. Смолу промывали буфером для уравнивания (25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl), в объеме, приблизительно равном двум объемам смолы, и эктодомен белка F элюировали приблизительно двукратным объемом колонки буфера для элюирования (буфер для уравнивания с 250 mM имидазолом). Элюат подвергали диализу против 25 mM Tris-буфера, pH 7,5, 300 mM NaCl, и полученный раствор наносили на 5-мл хелатирующую колонку Hitrap, заполненную NiSO_4 (GE Healthcare). Связанный белок элюировали 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl и градиентом имидазола.

Элюаты после градиента имидазола в каждом случае оценивали с использованием вестерн-блотов против HIS₆ и/или окрашенных кумасси синим гелей для SDS-PAGE.

Фракции, содержавшие чистые конструкции, собирали и концентрировали до приблизительно 1 мг/мл с использованием концентратов Millipore Centrprep и/или элементов для концентрирования Vivaspin для последующего анализа/очистки

эксклюзионной хроматографией.

Анализ с помощью SEC и очистка эктодоменов F RSV

Эксклюзионную хроматографию (SEC) использовали для очистки и анализа нерасщепленных мономеров и расщепленных тримеров эктодомена белка F RSV. Этот способ также позволил очистку нерасщепленных эктодоменов белка F RSV от клеточных хозяев или примесей липидов и липопротеинов из среды. В случае образования чистых розеткообразных структур, нерасщепленную конструкцию Delp23 Furdel первоначально очищали в качестве мономера, а затем обрабатывали протеазой и повторно очищали с использованием SEC для очистки гомогенных розеткообразных структур (см. ниже). Было разработано два способа, ВЭЖХ-SEC и FPLC-SEC, которые также могут служить в качестве эффективной стадии очистки.

ВЭЖХ-SEC проводили с использованием колонки Biorad SEC (18 мм) с подвижной фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием стандартов Biorad ВЭЖХ-SEC для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV (соответствующие расщепленным конформациям "после слияния") элюируются в свободном объеме колонки в анализе, в то время как мономеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 75-85 кДа.

FPLC-SEC проводили на GE Healthcare FPLC с использованием колонки 16/60 Superdex 200 с подвижной фазой 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. С использованием высокомолекулярных стандартов GE Healthcare для калибровки системы авторы изобретения открыли, что розеткообразные структуры RSV элюируются в свободном объеме в анализе, в то время как монодисперсные тримеры RSV элюируются с кажущейся молекулярной массой приблизительно 140-160 кДа и мономеры RSV F элюируются с кажущейся молекулярной массой 75-85 кДа. Для очистки Delp21 Furx или Delp23 Furdel (мономеры) или Fusion Peptide Deletion (тример) RSV 0,5-2 мл приблизительно хелатирующего очищенного материала в концентрации 1 мг/мл наносили на уравновешенную колонку Superdex P200 16/60 со скоростью потока 0,5-2 мл/мин и соответствующие фракции собирали.

Расщепление трипсином конструкций Delp23 Furdel с образованием розеткообразных структур "после слияния"

Трипсин из плазмы быка (Sigma Aldrich, T8802: 10000-15000 BAEE единиц/мг трипсина) разбавляли до концентрации 1 мг/мл в 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl. Раствор полипептида эктодомена белка F RSV в концентрации 1 мг/мл (разбавленный в 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl) обрабатывали одним микролитром раствора трипсина (конечное соотношение масс 0,001:1 трипсин:F RSV или приблизительно 10-15 единиц BAEE трипсина на каждый миллиграмм F RSV) в течение 1 часа при 37°C. Мониторинг хода реакции проводили с помощью геля SDS-PAGE. Реакцию расщепления останавливали с использованием ингибитора трипсина (Gibco Soy Bean Trypsin Inhibitor с использованием равной массы ингибитора относительно массы трипсина). Было выявлено, что между стадией расщепления и последующей очисткой розеткообразных структур требовался период инкубации для обеспечения более высокой эффективности превращения мономера в розеткообразные структуры. Инкубацию проводили в течение от одного до 6 часов при 37°C для обеспечения более высокой эффективности образования розеткообразных структур. Расщепленный белок F RSV далее очищали от не превращенной мономерной структуры с использованием эксклюзионной хроматографии (как описано выше), где гомогенные розеткообразные структуры можно собирать во фракциях свободного объема колонки.

Очистка антигена F RSV из клеток CHO

Конструкции F RSV с делецией пептида слияния, которые не содержат HIS-метку, очищали способом катионной очистки. Материал CHO, содержащий экспрессированный тримерный антиген F RSV, концентрировали приблизительно до одной десятой исходного объема на системе для концентрирования с полыми волокнами GE Healthcare (MWCO 10000 кДа). Затем в концентрированном растворе проводили замену буфера четыре раза эквивалентным объемом 25 мМ ацетата натрия pH 6,0, 25 мМ NaCl. Полученный раствор, содержащий концентрированный тример F RSV в буфере ацетат/солевой раствор, наносили на предварительно загруженную колонку GE Healthcare HiTrap CM, которая была уравновешена буфером ацетат/солевой раствор. Белок элюировали с колонки с использованием ступенчатого градиента из 25 мМ ацетатного буфера, содержавшего 25, 150, 250, 500 или 1000 мМ NaCl (250 мМ и 500 мМ фракции NaCl, содержавшие основную часть элюированного материала). Этот материал можно было далее очищать с использованием очистки SEC, сходной с описанным выше протоколом.

Пример 6 - иммуногенность субъединиц F RSV у хлопковых хомячков

Иммуногенность и защитную способность субъединиц тримера RSV-F (RSV-F-fusion-peptide-deletion-trunc) и розеткообразных структур (RSV-F-delp23-furdel-trunc,cleaved), все из которых изготовлены с квасцами или MF59, оценивали в модели на хлопковых хомячках. Антиген, использованный для ELISA в этом исследовании, представлял собой RSV-F-fusion-peptide-deletion-trunc (таблица 4). Нейтрализацию оценивали против инфекционного RSV, штамм Long (таблица 5). Все комбинации были иммуногенными, индуцирующими ответы с высоким титром специфических к RSV-F IgG и нейтрализующих RSV антител, которые усиливали с помощью второй вакцинации, и обеспечивали защиту от назального заражения RSV.

Способы

Вакцинация и заражения хлопковых хомячков

Самок хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*) получали от Harlan Laboratories. Группы животных иммунизировали внутримышечно (внутримышечно, 100 мкл) указанными вакцинами на 0 и 21 сутки. Образцы сыворотки собирали через 3 недели после первой иммунизации (3wp1) и через 2 недели после второй иммунизации (2wp2). Иммунизированных или невакцинированных контрольных животных заражали интраназально (i.n.) с помощью 1×10^5 б.о.е. RSV Long через 4 недели после конечной иммунизации. Взятие крови и заражение RSV проводили под анестезии с помощью 3% изофлурана с использованием прецизионного испарителя.

Специфический для F RSV ELISA

Отдельные образцы сыворотки анализировали в отношении присутствия специфического к F RSV IgG способом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). На планшеты для ELISA (96-луночные MaxiSorp, Nunc) наносили в течение ночи при 4°C 1 мкг/мл очищенного F RSV (fusion-peptide deletion-trunc) в PBS. После промывания (PBS с 0,1% Tween-20), планшеты блокировали буфером Superblock Blocking Buffer в PBS (Thermo Scientific) в течение, по меньшей мере, 1,5 часов при 37°C. Затем планшеты промывали, добавляли серийные разведения сыворотки в разбавителе для анализа (PBS с 0,1% Tween-20 и 5% сывороткой козы) из экспериментальных или контрольных хлопковых хомячков и планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После промывания планшеты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом курицы против IgG хлопкового хомячка (Immunology Consultants Laboratory, Inc, разбавленное 1:5000 в разбавителе для анализа) в течение 1 часа при 37°C. Наконец, планшеты промывали и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора

субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М H_3PO_4 , и проводили считывание поглощения при 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов. Для каждого образца сыворотки строили график оптической плотности (OD) против логарифма обратной величины разведения сыворотки, полученный с помощью нелинейной регрессии (GraphPad Prism). Титры определяли как обратную величину разведения сыворотки при OD приблизительно 0,5 (нормализованную к стандартным объединенным сывороткам от инфицированных RSV хлопковых хомячков с определенным титром 1:2500, которую включали в каждый планшет).

Анализ микронеutralизации

Образцы сыворотки тестировали в отношении присутствия нейтрализующих антител с помощью анализа микронеutralизации. Двукратные серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки (HI) (в PBS с 5% HI-эмбриональной телячьей сывороткой(FBS)) добавляли к равному объему RSV, штамм Long, ранее титрованному до приблизительно 115 б.о.е./25 мкл. Смеси сыворотка/вирус инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO_2 , для обеспечения нейтрализации, а затем 25 мкл этой смеси (содержащей приблизительно 115 б.о.е.) инокулировали в лунки 96-луночных планшетов с клетками HEp-2 в двух экземплярах. Через 2 часа при 37° и 5% CO_2 , на клетки наслаивали 0,75% метилцеллюлозу/EMEM 5% HI-FBS и инкубировали в течение 42 часов. Количество инфекционных вирусных частиц определяли путем детекции образования синцития с помощью иммунного окрашивания с последующим автоматическим подсчетом. Титр нейтрализации определяют как обратную величину разведения сыворотки, вызывающую, по меньшей мере, 60% снижение количества синцитиев на лунку, относительно контролей (без сыворотки).

Вирусная нагрузка

Вирусную нагрузку определяли анализом бляшек. В частности, легкие извлекали через 5 суток после RSV и одну правую долю помещали в 2,5 мл модифицированной способом Дульбекко среды Игла (DMEM, Invitrogen) с 25% сахарозой и разрушали с помощью гомогенизатора тканей. Бесклеточные супернатанты от этих образцов хранили при -80°C. Для анализа в отношении инфекционного вируса, разведения очищенного гомогената легких (в PBS с 5% HI-FBS) инокулировали на смыкающиеся монослои клеток HEp-2 в объеме 200 мкл/лунка 12-луночного планшета. Через 2 часа с периодически осторожным качанием (37°C, 5% CO_2), инокулят удаляли и на клетки наслаивали 1,5 мл агарозы 1,25% SeaPlaque (Lonza) в минимальной поддерживающей среде Игла (EMEM, Lonza), дополненной 5% HI-FBS, глутамином и антибиотиками. После инкубации в течение 3-4 суток, на клетки вновь наслаивали 1 мл 1,25% агарозы в EMEM (Sigma), содержащей 0,1% нейтральный красный (Sigma). Через одни сутки подсчитывали бляшки с помощью освещенного бокса.

Альтернативным способом определения вирусной нагрузки является количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Вирусную нагрузку можно определять способом qRT-PCR с использованием олигонуклеотидных праймеров для гена RSV-F, как описано (I. Borg *et al*, Eur Respir J 2003; 21:944-51) с некоторыми модификациями. В кратком изложении, РНК выделяют из 140 мкл очищенного гомогената легких или из известного количества бляшкообразующих единиц (б.о.е.) RSV (определенного анализом бляшек и разбавленного гомогенатом легкого от неинфицированных животных), с использованием набора RNeasy (Qiagen) с конечным объемом элюирования 100 мкл H_2O . Синтез кДНК и ПЦР проводят в одной пробирке с использованием набора

SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR (Invitrogen) с 5 мкл элюированной РНК, 10 мкл каждого праймера и 50 мкМ каждого зонда (праймеры и зонды от Integrated DNA Technologies). Прямой праймер: TTGGATCTGCAATCGCCA (SEQ ID NO: 72).

Обратный праймер: CTTTGTGATCTTGTTCACTTCTCCTTCT (SEQ ID NO: 73). Зонд: 5'-

карбоксифлуоресцеин (FAM)-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT-

тертаметилкарбоксиродамин(TAMRA)-3' (SEQ ID NO: 74). Амплификацию и детекцию проводят с помощью ABI Prism 7900HT или 7500 (Applied Biosystems). Пороговую величину циклов (Ct) определяют для каждого образца как количество циклов, при которых флуоресцентный сигнал сначала становится детектируемым выше

установленного порога. Затем определяют эквиваленты б.о.е. для каждого образца, исходя из стандартной кривой Ct против логарифма определенного числа копий вирусной РНК.

Результаты

Хлопковых хомячков в качестве модели широко использовали для исследования патогенеза и иммунитета RSV, вследствие многих сходств между индуцируемым RSV заболеванием у хлопковых хомячков и человека. Двумя важными соответствиями являются эффективность нейтрализующих антител и усиленная гистопатология легких, ассоциированная с инактивированной формалином вакцинацией RSV. Хлопковые хомячки являются более чувствительными к инфекции RSV, чем другие небольшие животные, такие как мыши.

Для оценки иммуногенности субъединичных вакцин авторов изобретения против RSV-F, группы самок хлопковых хомячков вакцинировали внутримышечно различными дозами тримеров (RSV-F-fusion-peptide-deletion-trunc) или розеткообразных структур (RSV-F-delp23-furdel-trunc, расщепленный), каждый из которых был изготовлен либо с квасцами, либо с MF59. Во всех случаях, однократная иммунизация была достаточной для индукции как F-специфического, так и нейтрализующего антитела в сыворотке при измерении через три недели после первой вакцинации (3wp1). Всем хлопковым хомячкам вводили гомологичную вспомогательную иммунизацию через три недели после первой иммунизации, и это приводило к существенному увеличению F-специфического IgG и нейтрализующих антител при измерении через две недели (2wp2). Главным образом, иммуногенность розеткообразных структур была равной или превышающей иммуногенность у тримеров, состав MF59 увеличивал титры более, чем состав квасцов и более высокие дозы белка приводили к более высоким титрам, хотя были некоторые исключения.

Для определения защитной способности субъединичных вакцин, всех хлопковых хомячков инфицировали через четыре недели после второй вакцинации RSV назальным путем и вирусную нагрузку в легких измеряли через пять суток в анализе бляшек. Во всех случаях субъединичная вакцинация обеспечивала защиту от заражения, поскольку вирусная нагрузка в легких у вакцинированных хлопковых хомячков была более чем на три порядка ниже чем у неиммунизированных, но зараженных контрольных животных.

Таблица 4
Сывороточные титры F-специфического IgG

		Сывороточные титры F-специфического IgG ^a			
		квасцы		MF59	
Взятие сыворотки	Доза белка (мкг)	Тример	Розеткообразные структуры	Тример	Розеткообразные структуры
3wp1	10	20276	36841	10251	22415
	1	18341	20802	3712	28610

	0,1	2698	6896	1065	8293
2wp2	10	103670	97174	130016	156144
	1	142331	102405	177441	299501
	0,1	11581	34354	50238	111099

- 5 ^a геометрическое среднее значение титра для отдельных хлопковых хомячков (7-8 на группу)
тримерный иммуноген представлял собой RSV-F-fusion-peptide-deletion-trunc
иммуноген в виде розеткообразных структур представлял собой RSV-F-delp23-furdel-trun, расщепленный.

Таблица 4А

Титр вируса в легких через 5 суток после заражения RSV^a

	Вакцинация	Доза белка (мкг)	Титр вируса ^b
10	Нет	-	822760
	тример/квасцы	10	546
		1	636
		0,1	903
	розеткообразные структуры/квасцы	10	305
		1	341
15		0,1	548
	тример/MF59	10	360
		1	301
		0,1	456
	розеткообразные структуры/MF59	10	244
		1	257
20		0,1	716

^a интраназальное заражение 1×10^5 бляшкообразующих единиц (б.о.е.) RSV Long^b б.о.е./грамм легкого через 5 суток после заражения

Геометрическое среднее значение титров от 7-8 отдельных хлопковых хомячков/группа.

Если отдельное животное имело титр <203 (предел детекции) ему приписывали титр 100

Таблица 5

Нейтрализующий RSV титр в сыворотке

		Нейтрализующий RSV титр в сыворотке ^a			
		Квасцы		MF59	
Взятие сыворотки	Доза белка (мкг)	Тример	Розеткообразные структуры	Тример	Розеткообразные структуры
3wp1	10	628	1050	578	229
	1	208	633	165	205
	0,1	57	200	51	65
2wp2	10	3669	4015	3983	3436
	1	3369	2844	5728	3940
	0,1	744	1902	2414	2093

- 35 ^a титры нейтрализации с 60% уменьшением синцития
Геометрическое среднее значение титра для объединенных двух групп по 3-4 хлопковых хомячка на группу

Пример 7 - РНК-вакцина против RSV

Синтез РНК

- 40 Плазмидная ДНК, кодирующая репликон альфавируса (ФИГ. 4, SEQ ID NO: 77) служила в качестве матрицы для синтеза РНК *in vitro*. Для этих экспериментов использовали полноразмерный гликопротеин слияния с поверхностью RSV (RSV-F) (ФИГ. 4). При доставке репликонов в эукариотические клетки положительная РНК транслировалась с образованием неструктурных белков, которые вместе реплицировали геномную РНК и транскрибировали большое количество субгеномной мРНК, кодирующей гетерологичный продукт гена. Вследствие отсутствия экспрессии
- 45 структурных белков альфавируса, репликоны неспособны индуцировать образование инфекционных частиц. Промотор бактериофага (Т7 или SP6) выше кДНК альфавируса упрощает синтез РНК репликона *in vitro* и рибозим вируса гепатита дельта (HDV) непосредственно ниже поли(А)-конца образует правильный 3'-конец благодаря его

активности саморасщепления.

После линеаризации плазмидной ДНК ниже рибозима HDV с помощью пригодной эндонуклеазы рестрикции синтезировали избыточные транскрипты *in vitro* с использованием происходящей из бактериофага T7 или SP6 ДНК-зависимой РНК-

5 полимеразы. Транскрипцию проводили в течение 2 часов при 37°C в присутствии 7,5 мМ (РНК-полимераза T7) или 5 мМ (РНК-полимераза SP6) каждого из нуклеозидтрифосфатов (АТР, СТР, GTP и UTP) согласно инструкциям, предоставленным изготовителем (Ambion, Austin, TX). После транскрипции матричную ДНК расщепляли ДНКазой TURBO (Ambion, Austin, TX). РНК реплика осаждали с помощью LiCl и
10 разбавляли в не содержащей нуклеазу воде. Некэпированную РНК кэпировали посттрансляционно с помощью кэпирующего фермента вируса коровьей оспы (VCE) с использованием кэпирующей системы ScriptCap m⁷G Capping System (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) как описано в руководстве пользователя.

15 Посттрансляционно кэпированную РНК осаждали с помощью LiCl и разбавляли не содержащей нуклеазу водой. Концентрацию образцов РНК определяли путем измерения оптической плотности при 260 нм. Целостность транскриптов *in vitro* подтверждали денатурирующим агарозным гель-электрофорезом.

Состав липидных наночастиц (липосом) RV01(01)

20 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметил-3-аминопропан (DlinDMA) синтезировали с использованием ранее опубликованного способа [Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. Journal of Controlled Release, 107: 276-287 (2005)]. 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) приобретали от Genzyme. Холестерин получали от Sigma-Aldrich (St. Lois, MO). 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси
25 (полиэтиленгликоль)-2000] (соль аммония) (PEG DMG 2000), 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (соль аммония) приобретали от Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Получали свежие исходные растворы липидов в этаноле. 37 мг DlinDMA, 11,8 мг DSPC, 27,8 мг холестерина и 8,07 мг PEG DMG 2000 взвешивали и растворяли в 7,55 мл
30 этанола. Свежеприготовленный исходный раствор липидов осторожно качали при 37°C в течение приблизительно 15 минут до получения гомогенной смеси. Затем 755 мкл исходного раствора добавляли к 1,245 мл этанола с получением рабочего исходного раствора липидов 2 мл. Это количество липидов использовали для образования LNP с 250 мкг РНК в соотношении 8:1 N:P (азот к фосфату). Для этого вычисления
35 используют протонируемый азот на DlinDMA (катионный липид) и фосфатах на РНК. Предполагали, что каждый мкг самореплицирующейся молекулы РНК содержал 3 нмоль анионного фосфата, а также что каждый мкг DlinDMA содержал 1,6 нмоль катионного азота. 2 мл рабочего раствора РНК также получали из исходного раствора
40 ~ 1 мкг/мкл в 100 мМ цитратном буфере (pH 6) (Teknova, Hollister, CA)). Три 20-мл стеклянных флакона (с мешалками) промывали раствором RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, CA) и промывали большим количеством воды MilliQ перед применением для удаления из флаконов примесей РНКазы. Один из флаконов использовали для рабочего раствора РНК, а другие использовали для сбора липидов
45 и смесей РНК (как описано ниже). Рабочие растворы липидов и РНК нагревали при 37°C в течение 10 минут, а затем заполняли ими 3-см³ шприцы luer-lok (BD Medical, Franklin Lakes, NJ). 2 мл цитратного буфера (pH 6) помещали в другой 3-см³ шприц. Шприцы, содержащие РНК и липиды, соединяли со смесителем Т (PEEK™ ID области

перехода 500 мкм, Idex Health Science, Oak Harbor, WA) с использованием трубки FEP ([фторированный этилен-пропилен] 2 мм ID x 3 мм OD, Idex Health Science, Oak Harbor, WA). На выходе из Т-смесителя также была трубка FEP (2 мм ID x 3 мм). Третий шприц, содержащий цитратный буфер, соединяли с отдельным фрагментом трубки (2 мм ID x 3 мм OD). Затем все шприцы приводили в действие со скоростью потока 7 мл/мин с использованием насоса для шприца (kdScientific, model № KDS-220, Holliston, MA). Выходящие трубки были расположены так, чтобы собирать смеси в 20-мл стеклянный флакон (при перемешивании). Эту мешалку отбирали и раствору в этаноле/воде позволяли уравновеситься до комнатной температуры в течение 1 часа. 4 мл смеси помещали в 5-см³ шприц (BD Medical), который был соединен с фрагментом трубки FEP (2 мм ID x 3 мм OD, Idex Health Science, Oak Harbor, WA) и в другой 5-см³ шприц, соединенный с трубкой FEP равной длины, помещали равное количество 100 мМ цитратного буфера (pH 6). Два шприца приводили в действие со скоростью потока 7 мл/мин с использованием насоса для шприцов и конечную смесь собирали в 20-мл стеклянный флакон (при перемешивании). Далее смесь, собранную на второй стадии смешивания (липосомы) пропускали через мембрану Mustang Q (анионо-обменная подложка, которая связывает и удаляет анионные молекулы, полученные от Pall Corporation, Ann Arbor, MI, США). Перед пропуском, 4 мл 1 М NaOH, 4 мл 1 М NaCl и 10 мл 100 мМ цитратного буфера (pH 6) последовательно пропускали через мембрану Mustang. Липосомы нагревали в течение 10 минут при 37°C, а затем их пропускали через фильтр mustang. Далее, липосомы концентрировали до 2 мл и подвергали диализу против 10-15 объемов 1X PBS (от Teknova) с использованием системы проточной фильтрации вдоль потока (TFF) перед выделением конечного продукта. Систему TFF и фильтрационные мембраны с полыми волокнами приобретали от Spectrum Labs (Rancho Dominguez, CA) и использовали согласно руководству изготовителей. Использовали полисульфоновые фильтрационные мембраны с полыми волокнами (номер партии P/N: X1AB-100-20P) с пределом 100 кДа и площадью поверхности 8 см². Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* составы разбавляли до требуемой концентрации РНК посредством 1X PBS (от Teknova).

Способ получения катионной эмульсии 17 (CNE17)

Сквален, триолеат сорбитана (Span 85), и моноолеат сорбитана полиоксиэтилена (Tween 80) приобретали от Sigma (St. Louis, MO, USA). 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP) приобретали от Lipoid (Ludwigshafen, Германия). Катионные наноэмульсии (CNE) приобретали аналогично заряженному MF59, как описано ранее, с небольшими модификациями (Ott, *et al.* Journal of Controlled Release, 79 (1-3):1-5 (2002)). В кратком изложении, растворимые в масле компоненты (т.е. сквален, span 85, катионные липиды, липидные поверхностно-активные вещества) объединяли в стакане, липидные компоненты растворяли в хлороформе (CHCl₃) или дихлорметане (DCM). Полученный раствор липидов добавляли прямо в масло вместе со span 85. Растворителю позволяли испариться при комнатной температуре в течение 2 часов в вытяжном шкафу, а затем водную фазу объединяли и образец гомогенизировали с использованием гомогенизатора IKA T25 при 24К об./мин. с получением гомогенного сырья. Первичные эмульсии пропускали от трех до пяти раз через гомогенизатор Microfluidizer M110S или M110PS с охлаждающей рубашкой с ледяной баней при давлении гомогенизации приблизительно 15k-20k фунт./кв. дюйм (Microfluidics, Newton, MA). 20-мл образцы партий извлекали из установки и хранили при 4°C. В таблице ниже описана композиция CNE17.

Таблица 6 Композиция CNE17					
CNE	Катионный липид (+)	мг/мл +ли- пид	Поверхност- но-активное вещество	Сквален	Буфер/вода
CNE17	DOTAP (в DCM)	1,40	0,5% SPAN 85 0,5% Tween 80	4,3%	10 мМ цитрат- ный буфер, pH 6,5

Образование комплексов с РНК

Количество азота в растворе вычисляли из концентрации катионного липида, например, DOTAP имеет 1 атом азота, который может быть протонирован, на молекулу. Концентрацию РНК использовали для вычисления количества фосфата в растворе с использованием оценки 3 нмоль фосфата на микрограмм РНК. Путем варьирования количества РНК:липид можно модифицировать соотношение N/P. Подвергали образованию комплекса РНК с CNE17 при соотношениях азот/фосфат (N/P) 10:1. С использованием этих величин РНК разбавляли до соответствующей концентрации в не содержащей РНКазу воде и добавляли прямо к равному объему эмульсии при мягком встряхивании. Раствору позволяли осесть при комнатной температуре в течение приблизительно 2 часов. После образования комплекса полученный раствор разбавляли до требуемой концентрации перед введением.

Электропорация

Электропорация является высоко эффективным способом для доставки пДНК-вакцин и этот способ использовали для доставки самореплицирующихся РНК. Мышей подвергали анестезии под изофлураном, обе задние лапы тщательно брили для обнажения области на конечности, подлежащей введению. Дозу вакцины объемом 30 мкл инъецировали в икроножную мышцу задней конечности с использованием 1/2-см³ инсулинового шприца. Мышцу подвергали электропорации с использованием системы Elgen® DNA Delivery System (Inovio, San Diego). Параметры устройства являются следующими: 60 В, 2 импульса, каждый через 60 мс. Другую дозу аналогично доставляли во вторую конечность с последующей электропорацией.

Частицы вирусного репликона (VRP)

Для сравнения РНК-вакцин с традиционными РНК-векторными подходами для достижения экспрессии *in vivo* репортерных генов или антигенов авторы настоящего изобретения использовали частицы вирусного репликона (VRP), продуцированные из клеток ВНК способами, описанными Perri et al. В этой системе репликоны антигена (или репортерного гена), состоящие из химерных репликонов альфавируса (VCR), происходящих из генома вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), сконструированных так, чтобы они содержали 3'-концевые последовательности (3'-UTR) вируса Sindbis и сигнал упаковывания вируса Sindbis (PS) (см. фиг. 2 Perri et al). Эти репликоны упаковывали в VRP путем коэлектропорации их в клетки почек детенышей хомячка (ВНК) вместе с дефектными вспомогательными РНК, кодирующими гены капсида вируса Sindbis и гликопротеинов (см. фиг. 2 Perri et al). Затем VRP собирали и титровали стандартными способами и инокулировали в животных в культуральной жидкости или других изотонических буферах. Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, Dubensky TW, Jr. et al (2003) An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. J Virol 77: 10394-10403.

Субъединичная вакцина на основе тримера F RSV

Тример F RSV представляет собой рекомбинантный белок, содержащий эктодомен F RSV с делецией области пептида слияния, препятствующей связыванию с другими

тримерами. Полученная конструкция формирует гомогенный тример, как наблюдают с помощью эксклюзионной хроматографии, и имеет предполагаемый фенотип, согласующийся с конформацией F "после слияния", как наблюдают с помощью электронной микроскопии. Белок экспрессировали в клетках насекомых и очищали с помощью HIS-метки, слитой с С-концом конструкции, с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием общепринятых способов. Полученный образец белка проявляет более чем 95% чистоту. Для оценки вакцины на основе субъединиц F *in vivo*, 100 мкг/мл тримерного белка адсорбировали на 2 мг/мл квасцов с использованием 10 мМ гистидинового буфера, pH 6,3, и изотоничность доводили с помощью хлорида натрия до 150 мМ. Субъединичный F-белок адсорбировали на квасцы в течение ночи при осторожном перемешивании при 2-8°C. Заданные pH и осмолярность конечной вакцины составляли 6,5-7,5 и 240-360 мОсм/кг. Вакцину охарактеризовали в отношении адсорбации белка с помощью SDS-PAGE (Invitrogen Corporation, США) и в отношении содержания эндотоксинов с помощью анализа LAL (Charles River Laboratories, USA). Вакцину перемешивали путем осторожного переворачивания перед иммунизацией.

Исследования иммуногенности у мышей

Группы из 10 самок мышей BALB/c в возрасте 8-10 недель и массой приблизительно 20 граммов иммунизировали на 0 сутки и на 21 сутки, и на 14, 35 и 49 сутки проводили взятие крови. Всем животным инъецировали в четырехглавую мышцу двух задних конечностей, по эквивалентному объему в каждую (50 мкл на область) для всего 100 мкл вакцины, доставляющей дозу антигена 10 мкг. Когда требовалось измерение Т-клеточных ответов, селезенки собирали на 35 или 49 сутки.

Вакцинация и заражение у хлопковых хомячков

Самок хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*) приобретали от Harlan Laboratories. Все эксперименты были одобрены и их проводили согласно Novartis Animal Care and Use Committee. Группы животных иммунизировали внутримышечно (i.m., 100 мкл) указанными вакцинами на 0 и 21 сутки. Через 2 недели после каждой иммунизации проводили взятие образцов сыворотки. Иммунизированных и невакцинированных контрольных животных заражали интраназально (i.n.) 1×10^5 б.о.е. RSV через 4 недели после конечной иммунизации. Взятие крови и заражение RSV проводили под анестезией 3% изофлураном с использованием прецизионного испарителя.

Анализ функции Т-клеток мыши

Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточных цитокинов

От двух до пяти селезенок от идентично вакцинированных мышей BALB/c объединяли и получали суспензии отдельных клеток для культивирования. Получали две стимулированных антигеном культуры и две нестимулированных культуры для каждого пула спленоцитов. Стимулированные антигеном культуры содержали 1×10^6 спленоцитов, пептид F RSV 85-93 (1×10^{-6} М), пептид F RSV 249-258 (1×10^{-6} М), пептид F RSV 51-66 (1×10^{-6} М), mAb против CD28 (1 мкг/мл), и брэфелдин А (1:1000). Нестимулированные культуры не содержали пептиды F RSV, а в остальном были идентичными стимулированным культурам. После культивирования в течение 6 часов при 37°C культуры обрабатывали в отношении иммунофлуоресценции. Клетки промывали, а затем окрашивали флуоресценно мечеными моноклональными антителами против CD4 и против CD8 (mAb). Клетки вновь промывали, а затем фиксировали с помощью Cytofix/сytoperm в течение 20 минут. Затем фиксированные клетки промывали буфером для промывания Perm, а затем окрашивали флуоресцентно мечеными mAb,

специфичными к IFN-g, TNF-a, IL-2 и IL-5. Окрашенные клетки промывали, а затем анализировали на проточном цитометре LSR II. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение FlowJo. Подгруппы CD4+8- и CD8+4- Т-клеток анализировали по отдельности. Для каждой подгруппы в данном образце определяли % положительных по цитокинам клеток. % специфичных к антигену F RSV Т-клеток вычисляли в качестве разности между % положительных по цитокинам клеток в стимулированных антигеном культурах и % положительных по цитокинам клеток в нестимулированных культурах. 95% доверительный интервал для % специфичных к антигену клеток определяли с использованием стандартных способов (Statistical Methods, 7th Edition, G.W. Snedecor and W.G. Cochran).

Анализ секретируемых цитокинов

Культуры для анализа секретируемых цитокинов были сходными с культурами для иммунофлуоресцентного анализа внутриклеточных цитокинов, за исключением отсутствия в них брефелдина. Культуральные супернатанты собирали после культивирования в течение ночи при 37°C и анализировали в отношении множества цитокинов с использованием наборов для Th1/Th2-цитокинов мыши от Meso Scale Discovery. Количество каждого цитокина на культуру определяли из стандартных кривых, полученных с использованием очищенных рекомбинантных цитокинов, предоставленных изготовителем.

F RSV-специфический ELISA

Индивидуальные образцы сыворотки анализировали в отношении присутствия специфичного к F RSV IgG твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA). На планшеты для ELISA (96-луночные MaxiSorp, Nunc) наносили в течение ночи при 4°C 1 мкг/мл очищенного F RSV (delp23-furdel-trunc, нерасщепленный) в PBS. После промывания (PBS с 0,1% Tween-20), планшеты блокировали буфером Superblock Blocking Buffer в PBS (Thermo Scientific) в течение, по меньшей мере, 1,5 часов при 37°C. Затем планшеты промывали, добавляли серийные разведения сыворотки в разбавителе для анализа (PBS с 0,1% Tween-20 и 5% сывороткой козы) из экспериментальных или контрольных хлопковых хомячков и планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После промывания планшеты инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом курицы против IgG хлопкового хомячка (Immunology Consultants Laboratory, Inc, разбавленное 1:5000 в разбавителе для анализа) в течение 1 часа при 37°C. Наконец, планшеты промывали и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М H₃PO₄, и проводили считывание поглощения при 450 нм с использованием устройства для считывания планшетов. Для каждого образца сыворотки строили график оптической плотности (OD) против логарифма обратной величины разведения сыворотки, полученный с помощью нелинейной регрессии (GraphPad Prism). Титры определяли как обратную величину разведения сыворотки при OD приблизительно 0,5 (нормализованную к стандартным объединенным сывороткам от инфицированных RSV хлопковых хомячков с определенным титром 1:2500, которую включали в каждый планшет).

Анализ микронеutralизации

Образцы сыворотки тестировали в отношении присутствия нейтрализующих антител с помощью теста нейтрализации в виде уменьшения бляшек (PRNT). Двукратные серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки (HI) (в PBS с 5% HI-эмбриональной телячьей сывороткой(FBS)) добавляли к равному объему RSV Long, ранее титрованному до приблизительно 115 б.о.е./25 мкл. Смеси сыворотка/вирус

инкубировали в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂, для обеспечения нейтрализации, а затем 25 мкл этой смеси (содержащей приблизительно 115 б.о.е.) инокулировали в лунки 96-луночных планшетов с клетками HEp-2 в двух экземплярах. Через 2 часа при 37° и 5% CO₂, на клетки наслаивали 0,75% метилцеллюлозу/EMEM 5% HI-FBS и инкубировали в течение 42 часов. Количество инфекционных вирусных частиц определяли путем детекции образования синцития с помощью иммунного окрашивания с последующим автоматическим подсчетом. Титр нейтрализации определяют как обратную величину разведения сыворотки, вызывающего, по меньшей мере, 60% снижение количества синцитиев на лунку, относительно контролей (без сыворотки).

Вирусная нагрузка

Вирусную нагрузку определяли анализом бляшек. В частности, легкие извлекали через 5 суток после RSV и одну правую долю помещали в 2,5 мл модифицированной средой Дульбекко среды Игла (DMEM, Invitrogen) с 25% сахарозой и разрушали с помощью гомогенизатора тканей. Бесклеточные супернатанты от этих образцов хранили при -80°C. Для анализа в отношении инфекционного вируса, разведения очищенного гомогената легких (в PBS с 5% HI-FBS) инокулировали на смыкающиеся монослои клеток HEp-2 в объеме 200 мкл/лунка 12-луночного планшета. Через 2 часа с периодическим осторожным качанием (37°C, 5% CO₂), инокулят удаляли и на клетки наслаивали 1,5 мл агарозы 1,25% SeaPlaque (Lonza) в минимальной поддерживающей среде Игла (EMEM, Lonza), дополненной 5% HI-FBS, глутамином и антибиотиками. После инкубации в течение 3-4 суток, на клетки вновь наслаивали 1 мл 1,25% агарозы в EMEM (Sigma), содержащей 0,1% нейтральный красный (Sigma). Через одни сутки подсчитывали бляшки с помощью освещенного бокса.

Патология легких у хлопковых хомячков

Через пять суток после заражения RSV легкие собирали и извлекали по 4 доли от каждого животного и фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином (NBF) путем осторожного интратрахеального вливания с последующей фиксацией погружением. Ткани обрабатывали стандартным способом для получения окрашенных гематоксилином и эозином срезов для микроскопического исследования. Данные оценивали с использованием модификации ранее опубликованных критериев [Prince GA, et al., 2001] для следующих параметров: перибронхиолит, альвеолит, бронхит, периваскулярные клеточные инфильтраты и интерстициальный пневмонит. Очаги повреждения оценивали по 4-уровневой полуколичественной шкале. Минимальное (+) изменение включало один или более небольших очагов; мягкое (++) изменение включало очаги от небольшого до среднего размера; умеренное (+++) изменение включало частые очаги и/или очаги умеренного размера; и выраженное (+++++) изменение демонстрировало от экстенсивных до сливных очагов, поражающих большую часть/всю ткань.

Пример 7

А - исследование с заражением RSV хлопковых хомячков (CRIS14)

Для этого эксперимента использовали репликон A317, который экспрессирует поверхностный гликопротеин слияния RSV (RSV-F). Хлопковым хомячкам (*Sigmodon hispidus*), 8 животных на группу, проводили двухсторонние внутримышечные вакцинации (50 мкл на конечность) на 0 и 21 сутки с помощью простой самореплицирующейся РНК (A317, 1 мкг или 10 мкг), самореплицирующейся РНК, изготовленной в LNP [RV01(01), A317, 0,1 мкг или 1 мкг), VRP (5×10⁶ ME), экспрессирующие RSV-F, субъединичную вакцину тример F/квасцы (10 мкг), или инактивированную формалином вакцину против RSV (5200 FI-б.о.е.). Сыворотку собирали для анализа антител на 14 (2wp1) и 35 (2wp2)

сутки. Всех животных заражали 1×10^5 б.о.е. RSV интраназально на 49 сутки и легкие извлекали на 54 сутки (5dpc) для определения вирусной нагрузки и патологии легких.

Результаты

Таблица 7

Сывороточные титры F-специфических IgG на 14 и 35 сутки

	вакцина	доза	F-специфический IgG	F-специфический IgG
			2wp1	2wp2
10	A317	10 мкг	198	1599
	A317	1 мкг	78	526
	CNE17	1 мкг	408	4918
	CNE17	0,1 мкг	325	2512
	RV01(01)	1 мкг	531	4351
	RV01(01)	0,1 мкг	134	1033
	VRP	5×10^6 ME	961	5864
	F-тример/квасцы	10 мкг	3526	111893
15	FI-RSV	5200 FI-б.о.е.	17	2074
	нет		5	5

Таблица 7. Сывороточные титры F-специфического IgG у хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*), по 8 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа антител проводили на 14 (2wp1) и 35 (2wp2) сутки, всех животных заражали 1×10^5 б.о.е. RSV интраназально на 49 сутки. Легкие извлекали на 54 сутки (5dpc) для определения вирусной нагрузки и патологии легких. Данные представлены в качестве геометрического среднего значения титров для 8 отдельных хлопковых хомячков на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции) ему приписывали титр 5.

Таблица 8

Сывороточные нейтрализующие RSV титры на 14 и 35 сутки

	вакцина	доза	PRNT60	PRNT60
			2wp1	2wp2
25	A317	10 мкг	78	240
	A317	1 мкг	58	70
	CNE17	1 мкг	91	269
	CNE17	0,1 мкг	63	145
	RV01(01)	1 мкг	103	667
	RV01(01)	0,1 мкг	46	130
	VRP	5×10^6 ME	149	683
	F-тример/квасцы	10 мкг	142	>5120
30	FI-RSV	5200 FI-б.о.е.	28	38
	нет		30	<20

Таблица 8. Сывороточные нейтрализующие RSV титры у хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*), по 8 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа антител проводили на 14 (2wp1) и 35 (2wp2) сутки. Данные представлены в качестве 60% снижения титров нейтрализации уменьшения бляшек. Геометрическое среднее значение титра для 2 объединенных групп по 4 хлопковых хомячка на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции) ему приписывали титр 5.

Таблица 9		
Титры вируса в легких через 5 суток после заражения RSV		
	вакцина	б.о.е./г легкого
45	доза	5dpc
	A317	10 мкг
	A317	1 мкг
	CNE17	1 мкг
	CNE17	0,1 мкг
	RV01(01)	1 мкг
	RV01(01)	0,1 мкг
	VRP	5×10^6 ME
		397
		659
		414
		572
		445
		716
		359

F-тример/квасцы	10 мкг	190
FI-RSV	5200 FI-б.о.е.	5248
нет (зараженные)		728618

Таблица 9: Титры вируса в легких через 5 суток после заражения RSV хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*), 8 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Всех животных заражали 1×10^5 б.о.е. RSV интраназально на 49 сутки. Легкие собирали на 54 сутки (5дpc) для определения вирусной нагрузки и патологии легких. Данные представлены в качестве бляшкообразующих единиц на грамм легкого при определении в анализе бляшек. Геометрическое среднее значение титров для 8 отдельных хлопковых хомячков на группу. Если отдельное животное имело титр <200 (предел детекции) ему приписывали титр 100.

Таблица 10 Показатели альвеолита легких через 5 суток после заражения RSV						
вакцина	доза	# хлопковых хомячков с указанным показателем альвеолита				
		0	1	2	3	4
A317I	10 мкг	8				
A317I	1 мкг	8				
CNE17	1 мкг	8				
CNE17	0,1 мкг	7	1			
RV01(01)	1 мкг	6	2			
RV01(01)	0,1 мкг	8				
VRP	5×10^6 ME	3	4	1		
F-тример/квасцы	10 мкг	7	1			
FI-RSV	5200 FI-б.о.е.	1	4	3		
нет (после заражения)		5	3			

Таблица 10. Альвеолит легких через 5 суток после заражения RSV хлопковых хомячков (*Sigmodon hispidus*), 8 животных на группу, после внутримышечной вакцинации на 0 и 21 сутки. Всех животных заражали 1×10^5 б.о.е. RSV интраназально на 49 сутки. Легкие собирали на 54 сутки (5дpc) для определения вирусной нагрузки и патологии легких. Очаги повреждения оценивали по 4-уровневой полуколичественной шкале. Минимальное (1) изменение включало один или более небольших очагов; мягкое (2) изменение включало очаги от небольшого до среднего размера; умеренное (3) изменение включало частые очаги и/или очаги умеренного размера; и изменение демонстрировало от экстенсивных до сливных очагов, поражающих большую часть/всю ткань.

Заключение

Одной из задач этого исследования было определение иммуногенности и защитной способности РНК репликона в модели RSV на хлопковых хомячках. Другой задачей была оценка эффекта липосом и составов CNE17 на иммуногенность и эффективность вакцины. Не включенная в состав РНК репликона индуцировала сывороточные специфичные к F IgG и нейтрализующие RSV антитела после одной вакцинации, и этому ответу способствовала вторая вакцинация. Липосомы и составы CNE17 были сходным образом эффективными в этой модели, способствуя достижению F-специфических титров IgG относительно 1 мкг РНК репликона приблизительно в 8-раз и титров нейтрализации в 4-10-раз (CNE17 и липосомы, соответственно) после второй вакцинации. Все вакцины на основе репликона РНК обеспечили защиту от назального заражения RSV, снижая вирусную нагрузку в легких более чем на 3 порядка величины при измерении через 5 суток. Уровень и защитная способность иммунного ответа, индуцированного 1 мкг РНК репликона, изготовленного с липосомами, превышала ответ, индуцированный 5×10^6 VRP, в пределах двух раз. Тримерная субъединица с адъювантами в виде квасцов индуцировала наиболее высокие общие титры IgG против F в ELISA, индуцировала наиболее высокие титры нейтрализации и индуцировала наиболее высокую степень защиты от титров RSV в легком при заражении для любого вакцинного препарата, протестированные в этом исследовании.

Пример 7B - Исследование иммуногенности RSV-F (10-1001)

Для этого эксперимента использовали тест с репликоном A317, который экспрессирует поверхностный гликопротеин слияния RSV (RSV-F). Мышам BALB/c, 10 животных на группу, проводили билатеральные внутримышечные вакцинации (50 мкг на конечность) на 0 и 21 сутки посредством VRP, экспрессирующих RSV-F (1×10^6

МЕ), простой самореплицирующейся РНК (А317, 1 мкг), самореплицирующейся РНК, доставляемой с использованием электропорации (А317, 10 мкг), самореплицирующейся РНК, изготовленной в липосомах [RV01(01), А317, 0,1 мкг или 1 мкг] и самореплицирующейся РНК, изготовленной с CNE17 (А317, 0,1 мкг или 1 мкг). Сыворотку собирали для анализа антител на 14 (2wp1), 35 (2wp2) и 49 (4wp2) сутки. Селезенки извлекали из 5 мышей на группу на 49 сутки (4wp2) для анализа Т-клеток.

Результаты

Таблица 11

Сывороточные титры F-специфических IgG на 14 сутки

	1 мкг A317	0,1 мкг RV01(01)	1 мкг RV01(01)	0,1 мкг CNE17	1 мкг CNE17	10 мкг A317 + EP	1E6 ME VRP
	529	14385	19299	2429	3373	5	6041
	1530	10713	19170	2060	4417	88	4912
	2734	12756	13860	2012	1927	964	12923
	2503	11546	17352	1887	3597	7235	7075
	5539	15300	22094	3174	5731	2558	6829
	1033	14072	21213	3904	2852	5105	4885
	5110	18274	17915	1481	3739	9806	3680
	1106	7873	15659	2345	4904	2787	9813
	1493	17175	6669	3084	3824	2576	8631
	3456	19730	13259	2497	3004	1858	6314
GMT	1980	13731	15903	2398	3590	1180	6685

Таблица 11. (10-1001) Сывороточные титры F-специфических IgG у мышей, 10 животных на группу, 14 суток после внутримышечной вакцинации. Данные представлены в качестве титров отдельных мышей и геометрических средних значений титров 10 отдельных мышей на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции), ему приписывали титр 5.

Таблица 12

Сывороточные титры F-специфических IgG на 35 сутки

	1 МКГ A317	0,1 МКГ RV01(01)	1 МКГ RV01(01)	0,1 МКГ CNE17	1 МКГ CNE17	10 МКГ A317 + EP	1Е6 ME VRP
	958	128208	227021	48079	8473	14612	813045
	12518	191729	212911	17589	58556	22805	365485
	4839	315786	303987	8522	12053	32156	961601
	10128	218147	335071	10985	20395	24090	349215
	18451	225622	155893	30801	51514	31053	297526
	9805	182693	519162	13372	26348	18105	207652
	19154	185342	169332	5137	80686	23918	1580066
	4490	82744	489441	47173	21014	9091	900889
	14674	190010	131361	78232	61076	21006	822285
	15223	553164	254500	24135	25499	9835	587121
GMT	8532	201892	253687	20767	29111	19117	579033

Таблица 12. (10-1001) Сывороточные титры F-специфических IgG у мышей, 10 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Сыворотку собирали для анализа антител на 35 сутки (2wp2). Данные представлены в качестве титров отдельных мышей и геометрических средних значений титров 10 отдельных мышей на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции), ему приписывали титр 5.

Таблица 13

Сывороточные титры F-специфических IgG на 49 сутки

1 мкг A317	0,1 мкг RV01(01)	1 мкг RV01(01)	0,1 мкг CNE17	1 мкг CNE17	10 мкг A317 + EP	1E6 ME VRP
1248	140407	133787	52747	34245	30388	366771
12441	155669	182995	29352	128030	20768	209400
4967	203059	211020	10857	17016	53763	360615
14536	134253	488698	28800	57250	28373	191475
31556	370726	158816	44613	76576	34318	139148
13815	184738	185184	20314	42357	35736	63839
20495	141644	103026	4546	101445	34611	192101
4800	76711	312096	27476	47285	10138	177858
19159	143275	139811	68386	55865	23958	130218
26836	479594	230331	24360	52871	13624	174378
GMT	10947	177168	194350	24891	53615	25888
180420						

Таблица 13. (10-1001) Сывороточные титры F-специфических IgG у мышей, 10 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа проводили на 49 сутки (4wp2). Данные представлены в качестве титров отдельных мышей и геометрических средних значений титров 10 отдельных мышей на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции), ему приписывали титр 5.

Таблица 14

Нейтрализующие RSV сывороточные титры на 35 сутки

A317 1 мкг	RV01(01) 0,1 мкг	RV01(01) 1 мкг	CNE17 0,1 мкг	CNE17 1 мкг	VRP 1E6 ME
2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2
NA	143	106	NA	NA	265
NA	272	62	NA	NA	73
NA	294	<40	NA	NA	77
NA	814	334	NA	NA	140
NA	67	86	NA	NA	290
NA	420	125	NA	NA	134
NA	<40	566	NA	NA	466
NA	104	292	NA	NA	127
NA	241	<40	NA	NA	75
NA	223	44	NA	NA	77
GMT	NA	176	96	NA	139

Таблица 14: (10-1001) Нейтрализующие RSV сывороточные титры у мышей, 10 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа проводили на 35 сутки (2wp2). Данные представлены в качестве титров нейтрализации, вызывающих 60% снижение бляшек у отдельных мышей и геометрическое среднее значение титра у 10 отдельных мышей на группу. Если отдельное животное имело титр <40 (предел детекции), ему приписывали титр 20. NA = не анализировали.

Таблица 15

Нейтрализующие RSV сывороточные титры на 49 сутки

A317 1 мкг	RV01(01) 0,1мкг	RV01(01) 1 мкг	CNE17 0,1 мкг	CNE17 1 мкг	VRP 1E6 ME
4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2
<40	194	82	<40	<40	161
<40	272	165	<40	70	64
<40	142	<40	<40	<40	126
<40	881	442	<40	76	151
<40	61	108	42	57	194
<40	426	156	52	<40	123
<40	78	814	<40	<40	1033
<40	<40	291	173	<40	174
<40	246	103	<40	<40	122
<40	574	396	<40	<40	76
GMT	<40	231	215	29	155

Таблица 15: (10-1001) Нейтрализующие RSV сывороточные титры у мышей, по 10 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа проводили на 49 сутки (4wp2). Данные представлены в качестве титров нейтрализации, вызывающих 60% снижение бляшек у отдельных мышей и геометрическое среднее значение титра у 10 отдельных мышей на группу. Если отдельное животное имело титр <40 (предел детекции), ему приписывали титр 20. NA = не анализировали.

Таблица 16 Т-клеточные ответы на 49 сутки				
4wp2 ответы CD4 Т-клеток селезенки	CD4+CD8- Т-клетки селезенки: % положительных по цитокинам и специфичных для пептида F RSV51-66			
	IFN γ +	IL2+	IL5+	TNF α +
VRP 1E6 ME	0,07 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,04
1 мкг A317	0,00 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
RV01(01) 1 мкг	0,04 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,03
RV01(01) 0,1 мкг	0,06 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03
CNE17 1 мкг	0,00 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02
CNE17 0,1 мкг	0,00 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,02
10 мкг vA317 + EP	0,02 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,03
нет	0,04 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,01

Таблица 16. (10-1001) Частоты специфичных к F RSV CD4+ Т-клеток селезенки на 49 сутки (4wp2). Представлена суммарная частота (антигенспецифических) положительных по цитокинам клеток (%) $\pm$ 95% доверительный полуинтервал. Суммарные частоты, показанные полужирным шрифтом, указывают на стимулированные ответы, которые были статистически значимыми > 0.

Таблица 17 Т-клеточные ответы на 49 сутки				
4wp2 ответы CD8 Т-клеток селезенки	CD8+CD4- Т-клетки селезенки: % положительных по цитокинам и специфичных для пептидов F85-93 и F249-258			
	IFN γ +	IL2+	IL5+	TNF α +
VRP 1E6 ME	3,48 $\pm$ 0,29	1,21 $\pm$ 0,18	-0,03 $\pm$ 0,05	3,31 $\pm$ 0,28
1 мкг A317	0,74 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,11	-0,03 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,14
RV01(01) 1 мкг	3,69 $\pm$ 0,28	1,43 $\pm$ 0,18	-0,01 $\pm$ 0,04	3,44 $\pm$ 0,27
RV01(01) 0,1 мкг	2,52 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,15	0,03 $\pm$ 0,03	2,31 $\pm$ 0,22
CNE17 1 мкг	1,25 $\pm$ 0,17	0,60 $\pm$ 0,12	0,01 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,16
CNE17 0,1 мкг	0,89 $\pm$ 0,15	0,49 $\pm$ 0,11	-0,03 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,14
10 мкг vA317 + EP	0,85 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,11	0,01 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,15
нет	0,01 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,05	-0,02 $\pm$ 0,05	0,02 $\pm$ 0,06

Таблица 17. (10-1001) Частоты специфичных к F RSV CD8+ Т-клеток селезенки на 49 сутки (4wp2). Представлена суммарная частота (антигенспецифических) положительных по цитокинам клеток (%) $\pm$ 95% доверительный полуинтервал. Суммарные частоты, показанные полужирным шрифтом, указывают на стимулированные ответы, которые были статистически значимыми > 0.

Заключение

Липосомальный состав значительно усиливал иммуногенность, как определяли по увеличенным титрам F-специфических IgG (8-30-кратное увеличение), титрам

нейтрализации и ответам CD4 и CD8 Т-клеток, относительно контроля в виде простой РНК. Неожиданно, титры F-специфических IgG и титры нейтрализации для RV01(01) в дозах как 0,1, и 1,0 мкг, были эквивалентны VRP (1×10^6 ME). Т-клеточные ответы для состава LNP были эквивалентны более высокой дозе VRP (1×10^6 ME). Состав самореплицирующейся РНК с CNE17 значимо усиливал иммуногенность, как определяли по увеличению титров F-специфических IgG (2-5-кратное увеличение), титров нейтрализации и CD4 и CD8 Т-клеточных ответов, относительно контроля в виде простой РНК. Электропорация РНК увеличивала иммуногенность относительно контроля в виде простой РНК, но была значимо более низкой, чем доставка липосом.

Пример 7С - Исследование иммуногенности RSV-F (10-1018)

Для этого эксперимента репликон A317, который экспрессирует поверхностный гликопротеин слияния RSV (RSV-F). Мышам BALB/c, 8 животных на группу, проводили билатеральную внутримышечную вакцинацию (50 мкл на конечность) на 0 и 21 сутки посредством VRP, экспрессирующих RSV-F (1×10^6 ME), простой самореплицирующейся РНК (A306, 1, 0,1, 0,01 мкг) и самореплицирующейся РНК, изготовленной в липосомах (RV01(01) с использованием способа 1 (A317, 10,0, 1,0, 0,1, 0,01 мкг). Взятие сыворотки для анализа антител проводили на 14 (2wp1) и (2wp2) сутки. Селезенки извлекали из 5 мышей на группу на 49 сутки (4wp2) для анализа Т-клеток.

Результаты

Состав липосом RV01(01) имел средний диаметр частиц Z 158 нм с индексом полидисперсности 0,14, эффективность инкапсулирования составляла 96%. Сывороточные титры F-специфических IgG на 14 и 35 сутки представлены в таблицах 18 и 19 и Т-клеточные ответы на 49 сутки представлены в таблицах 20 и 21.

Таблица 18

Сывороточные титры F-специфических IgG на 14 и 35 сутки

VRP 1E6 ME		A317					
		1 мкг		0,1 мкг		0,01 мкг	
2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
6334	39539	772	4687	5	2334	143	1377
1500	14895	5	142	5	161	5	333
5450	38252	109	2972	5	145	5	5
1835	12831	5	3674	5	97	5	5
2277	30326	5	5003	5	1077	5	175
2818	33437	663	8258	221	457	5	5
2405	22551	257	845	5	1558	5	456
2137	19179	5	1765	5	5	5	180
GMT	2735	24427	41	2144	8	259	8
							73

Таблица 18: (10-1018) Сывороточные титры F-специфических IgG у мышей, 8 животных на группу после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа проводили на 14 (2wp1) и 35 (2wp2) сутки. Данные представлены в качестве титров отдельных мышей и средних геометрических титров 8 отдельных хлопковых хомячков на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции), ему приписывали титр 5.

Таблица 19

Сывороточные титры F-специфических IgG на 14 и 35 сутки

RV01(01)								
10 мкг		1 мкг		0,1 мкг		0,01 мкг		
2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	
5880	82689	7255	45018	4072	22174	619	2872	
6126	42529	3009	22288	3974	27730	474	3603	
8069	76263	5385	23561	3272	15328	914	2692	
5966	108234	4148	53675	3968	24456	2011	11542	
8590	57912	4210	37004	4950	13014	903	4684	
7172	74162	2179	24179	2856	13694	1575	6720	
8072	122796	1640	5994	4073	17849	438	16514	
8706	83601	5725	28760	3797	17342	1058	13665	
GMT	7235	77338	3783	25790	3826	18325	879	6235

Таблица 19: Продолжение 23А. (10-1018) Сывороточные титры F-специфических IgG у мышей, 8 животных на группу, после внутримышечных вакцинаций на 0 и 21 сутки. Взятие сыворотки для анализа антител проводили на 14 (2wp1) и 35 (2wp2) сутки. Данные представлены в качестве титров отдельных мышей и средних геометрических титров (GMT) 8 отдельных хлопковых хомячков на группу. Если отдельное животное имело титр <25 (предел детекции), ему приписывали титр 5.

Таблица 20 Т-клеточный ответ на 49 сутки				
4wp2 ответы Т-клеток селезенки	CD4+CD8- Т-клетки селезенки: % положительных по цитокинам и специфичных к пептиду F RSV51-66			
	IFNg+	IL2+	IL5+	TNFa+
VRP 1E6 ME	0,00±0,02	0,07±0,02	0,00±0,01	0,07±0,03
1 мкг A317	0,01±0,01	0,03±0,02	0,00±0,01	0,03±0,02
0,1 мкг A317	0,00±0,01	0,01±0,01	0,00±0,00	0,01±0,01
0,01 мкг A317	0,00±0,00	0,01±0,01	0,01±0,01	0,00±0,01
RV01(01), 10 мкг	0,02±0,01	0,05±0,02	0,00±0,00	0,06±0,02
RV01(01), 1 мкг	0,03±0,02	0,08±0,02	0,00±0,01	0,09±0,02
RV01(01), 0,1 мкг	0,02±0,01	0,03±0,01	0,00±0,01	0,03±0,02
RV01(01), 0,01 мкг	0,00±0,00	0,02±0,02	0,01±0,01	0,02±0,02
нет	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,01	0,01±0,01

Таблица 20. Частоты специфичных к F RSV CD4+ Т-клеток селезенки на 49 сутки (эксперимент 10-1018, 4wp2). Представлена суммарная частота (антигенспецифических) положительных по цитокинам клеток (%) ± 95% доверительный полуинтервал. Суммарные частоты, показанные полужирным шрифтом, указывают на стимулированные ответы, которые были статистически значимыми > 0.

Таблица 21 Т-клеточные ответы на 49 сутки				
4wp2 ответы Т-клеток селезенки	CD8+CD4- Т-клетки селезенки: % положительных по цитокинам и специфичным к RSV F пептидов F85-93 и F249-258			
	IFN γ +	IL2+	IL5+	TNF α +
VRP 1E6 ME	2,45 $\pm$ 0,21	0,58 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,01	2,64 $\pm$ 0,21
1 мкг A317	1,68 $\pm$ 0,17	0,45 $\pm$ 0,09	0,00 $\pm$ 0,02	1,75 $\pm$ 0,18
0,1 мкг A317	0,21 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,08
0,01 мкг A317	0,06 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,06
RV01(01), 10 мкг	3,32 $\pm$ 0,23	0,69 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,02	3,90 $\pm$ 0,25
RV01(01), 1 мкг	1,81 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,02	2,04 $\pm$ 0,20
RV01(01), 0,1 мкг	0,91 $\pm$ 0,12	0,32 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,14
RV01(01), 0,01 мкг	0,58 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,11
нет	0,01 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,05
Таблица 21. Частоты F-специфических CD8 ⁺ Т-клеток селезенки на 49 сутки (эксперимент 10-1018, 4wp2). Представлена суммарная частота (антигенспецифических) положительных по цитокинам клеток (%) $\pm$ 95% доверительный полуинтервал. Суммарные частоты, показанные полужирным шрифтом, указывают на стимулированные ответы, которые были статистически значимыми > 0.				

Закключение

Липосомальный состав значительно усиливал иммуногенность, при определении по

увеличенным F-специфическим титрам IgG и частотам Т-клеток, относительно контролей в виде простой РНК. Титры F-специфических IgG и частоты CD8 Т-клеток для RV01(01) в дозе 10 мкг РНК были увеличены относительно группы VRP (1×10^6 МЕ).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ССЫЛКИ:

Представленные ниже ссылки включены в настоящий документ в качестве ссылок для всего, что в них описано.

1. *Fields Virology*. 4th edition, 2001.
2. Snell *et al.* (1997) *Virus Genes* 14:63-72.
3. Bembridge *et al.* (1999) *J Virol* 73: 10086-10094.
4. Li *et al.* (1998) *J Exp Med* 188:681-688.
5. Патент США № 6060308.
6. Yin *et al.* (2006) *Nature* 439:38-45.
7. Kim *et al.* (2007) *J Med Virol* 79: 820-828.
8. Yin *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(26):9288-93.
9. Chen *et al.* (2004) *J Virol* 78:4508-16.
10. Yang *et al.* (2002) *J Virol* 76:4634-42.
11. Harbury *et al.* (1993) *Science* 262:1401-1407.
12. Stevens *et al.* (2004) *Science* 303:1866-70.
13. Burkhard *et al.* (2001) *Trends Cell Biol* 11:82-88.
14. Section 5.5.2 of *Proteins* by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).
15. Yu (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54:1113-1129.
16. Muller *et al.* (2000) *Methods Enzymol* 328:261-282.
17. Beck & Brodsky (1998) *J Struct Biol* 122:17-29.
18. Lupas (1996) *Trends Biochem Sci* 21:375-382.
19. Adamson *et al.* (1993) *Curr Opin Biotechnol* 4:428-347.
20. Kammerer (1997) *Matrix Biol* 15:555-568.
21. Chao *et al.* (1998) *J Chromatog B Biomed Sci Appl* 715:307-329.
22. Arndt *et al.* (2002) *Structure* 10:1235-1248.
23. Liu & Lu (2002) *J Biol Chem* 277:48708-48713.
24. WO2006/011060.
25. Раздел 5.5.3. *Protein* by Creighton (ISBN 0-7167-2317-4).
26. Zhang & Chen (1999) *J Biol Chem* 274:22409-22413.
27. Slovic *et al.* (2003) *Protein Sci* 12:337-348.
28. Gardner & Dutch (2007) *J Virol* 81:8303-14.
29. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
30. Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
31. Greenbaum *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
32. Zurbriggen *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
33. Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
34. Mann *et al.* (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
35. Halperin *et al.* (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
36. Herbert *et al.* (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
37. Chen *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
38. Патент США № 6355271.
39. WO00/23105.
40. Патент США № 5057540.
41. WO96/33739.

42. EP-A-0109942.
43. WO96/11711.
44. WO00/07621.
45. Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- 5 46. Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
47. Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
48. WO95/17211.
49. WO98/42375.
50. Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- 10 51. WO99/27960.
52. Патент США № 6090406.
53. Патент США № 5916588.
54. EP-A-0626169.
55. WO99/52549.
- 15 56. WO01/21207.
57. WO01/21152.
58. Dyakonova *et al.* (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
59. FR-2859633.
60. Signorelli & Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- 20 61. WO2004/064715.
62. De Libero *et al.* (2005) *Nature Reviews Immunology* 5:485-496
63. Патент США № 5936076.
64. Old *et al.*, *J Clin Invest*, 113:1631-1640
65. US2005/0192248.
- 25 66. Yang *et al.* (2004) *Angew Chem Int Ed* 43:3818-3822.
67. WO2005/102049.
68. Goffet *et al.* (2004) *Am Chem Soc* 126:13602-13603.
69. WO03/105769.
70. Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- 30 71. WO90/14837.
72. Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
73. Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
74. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- 35 75. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
76. Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
77. Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
78. WO95/1 1700.
- 40 79. Патент США № 6080725.
80. WO2005/0971 81.
81. Tassignon *et al.* (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
82. Myers *et al.* (1990) pages 145-156 of *Cellular и molecular aspects of endotoxine reactions*.
83. Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 75.
- 45 84. Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
85. Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
86. Патент США № 4680338.
87. Патент США № 4988815.

88. WO92/15582.
89. Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:57 1-577.
90. Wu *et al.* (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
91. Vasilakos *et al.* (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- 5 92. Патенты США № 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000, и 6924293.
93. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- 10 94. WO2004/060308.
95. WO2004/064759.
96. Патент США № 6924271.
97. US2005/0070556.
98. Патент США № 5658731.
- 15 99. Патент США № 5011828.
100. WO2004/87 153.
101. Патент США № 6605617.
102. WO02/18383.
102. WO2004/018455.
- 20 104. WO03/082272.
105. WO2006/002422.
106. Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
107. Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
108. Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- 25 109. Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
110. Thompson *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.
111. Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
112. WO02/26757.
113. WO99/62923.
- 30 114. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
115. McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
116. WO98/40100.
117. Патент США № 6207646.
118. Патент США № 6239116.
- 35 119. Патент США № 6429199.
120. Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3): 654-658.
121. Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
123. WO01/95935.
- 40 124. Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
125. Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
126. WO03/035836.
127. WO01/22972.
128. Thompson *et al.* (2005) *J Leukoc Biol* 78: "The low-toxicity versions of LPS, MPL®
- 45 adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells".
129. Патентная заявка Великобритании GB-A-22202 11.
130. WO94/21292.
131. WO94/00153.

132. WO95/17210.

133. WO96/26741.

134. WO93/19780.

135. WO03/011223.

5 136. Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-249 1.

137. Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.

138. Патент США № 6586409.

139. Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.

140. US2005/0215517.

10 Полное описание всех документов, цитированных в настоящем документе, включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Формула изобретения

1. Иммуногенная композиция для индуцирования у субъекта иммунного ответа к F
15 респираторно-синцитиальному вирусу (F RSV), содержащая один или более
полипептидов F RSV, в которых аминокислоты 100-150 заменены аминокислотной
последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ
ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ
ID NO: 13, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 92, где аминокислотные положения
20 пронумерованы со ссылкой на нумерацию аминокислот в SEQ ID NO: 1 или 2 и где
указанная композиция по меньшей мере на 95% свободна от примесных липидов и
липопротеинов.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, где аминокислоты 100-150 указанного F RSV
заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12.

25 3. Иммуногенная композиция по п. 1, где аминокислоты 100-150 указанного F RSV
заменены аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 3, SEQ ID
NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID
NO: 11, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 92.

30 4. Иммуногенная композиция по п. 1, где F RSV находится в форме мономера, тримера
или любой их комбинации.

5. Иммуногенная композиция по п. 3, где F RSV представляет собой мономер, тример,
розеткообразную структуру или любую их комбинацию.

6. Иммуногенная композиция по любому из пп. 1-5, где указанный F RSV содержит
аминокислоты 23-99 и 151-524 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO: 2.

35 7. Иммуногенная композиция по п. 1, дополнительно содержащая адъювант.

8. Иммуногенная композиция по п. 7, где адъювант выбран из группы, состоящей
из соли алюминия, эмульсии типа "сквален-в-воде", соединения бензонафтиридина,
соединения фосфолипида, низкомолекулярного иммуностимулятора и комбинации
любых двух или более из любых указанных выше.

40 9. Иммуногенная композиция для индуцирования у субъекта иммунного ответа к F
RSV, содержащая совокупность растворимых полипептидов F RSV, содержащих
последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 22-524 SEQ
ID NO: 1, и дополнительно где указанная иммуногенная композиция по меньшей мере
на 95% свободна от примесных липидов и липопротеинов в расчете на массу, где
45 указанные полипептиды F RSV дополнительно содержат гетерологичный домен
олигомеризации, выбранный из домена тримеризации из гемагглютинирина вируса гриппа,
spike вируса SARS, gp41 ВИЧ, NadA, модифицированного GCN4, АТСазы и фибритина
бактериофага T4.

10. Иммуногенная композиция по п. 9, где тримеры представляют собой монодисперсные тримеры.

11. Иммуногенная композиция по п. 9, где полипептиды F RSV находятся в форме комбинации мономеров и тримеров.

5 12. Иммуногенная композиция по п. 11, где момеры и тримеры находятся в динамическом равновесии.

13. Иммуногенная композиция по п. 9, где растворимые полипептиды F RSV представляют собой полипептиды эктодомена.

10 14. Иммуногенная композиция по п. 13, где растворимые полипептиды F RSV являются нерасщепленными.

15. Иммуногенная композиция по п. 13, где растворимые полипептиды F RSV являются расщепленными.

16. Иммуногенная композиция по п. 9, дополнительно содержащая адъювант.

15

20

25

30

35

40

45

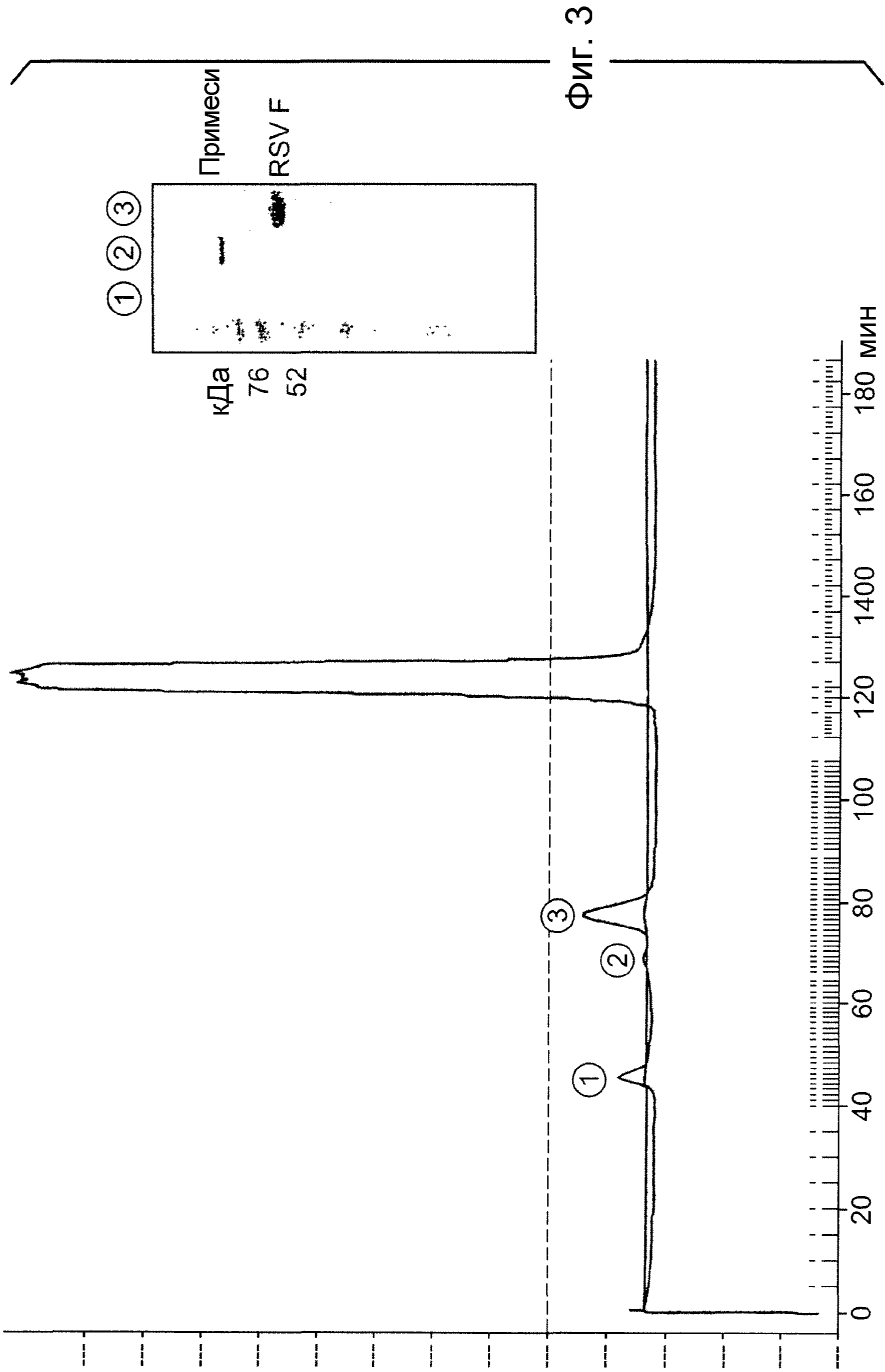
Конструкции для отщепления с клеточной поверхности

F RSV дикого типа	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNAGKSTTN-----	TM-C
Idealized Ent	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGDDDDKSGSG-	TM-C
GCN Ent	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGDDDDKSGSG	TM-C
Idealized FacXa	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGGIEGRGSG-	TM-C
GCN Thr	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGGIEGRGSGSG	TM-C
Idealized Thr	488	FDASISQINEKINQILAFIRKID	ELLHNINAGKSTTNGSGGLVPRGSG-	TM-C
GCN Thr	488	FDASISQVNEKINQSLAFIRKSD	ELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEGSGGLVPRGSGSG-	TM-C

TM-C = Трансмембранный домен + C-конец
IMITTTIIIVIIIVILLSLAVGLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN
Ent = Участок расщепления энтерокиназой - DDDDK
FacXa = Участок расщепления фактором Ха
Thr = Участок расщепления тромбином - LVPR

Фиг. 2

3/13



4/13

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA
GGAAGACAGCCCATTCCCTCAGAGCTTTGCGAGCGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAAGCAGGTC
ACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGG
ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTTCTAAGCACAAGTATCA
TTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAA
AACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCGCTCATGAGCGACC
CTGACCTGGAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT
TTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC
GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACT
CTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGA
GCGTCCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCT
GTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACT
TACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAG
AATAGCTATCAGTCCAGGCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCT
TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
CTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCAGGACGACGCGCAAAAACCTGCT
GGTTGGGCTCAACAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAAACACCAATACCATGAAAAATTAC
CTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAAGTGAAG
GGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTGAAGGCACAAGATAAC
ATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTG
CCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
AGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCAGCAGCCGATGAGGCTAAGGA
GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTG
GAAGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAA
AGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCGAGGCTGTACTCAA
GAGTGAAAAATTATCTTGCACTCCACCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAA
GGGCGTTATGCCGTGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGG
ACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCA
CCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAG
CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAG
GGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTGCGCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTTAA
AGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAAGCGCAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATAAGGGACG
TCAAGAAAAATGAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGTCTTGAATGGATGCAACA
CCCCGTAGAGACCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCC

Фиг. 4А

ATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGATGTGCC
TGAAAGTGCATTTTAAACCACGAGATTGACACAAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAA
ATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAG
GGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCT
GACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGTACAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
CATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGAGGACCGCATCGTGTGGAACAACTAGCCGCGACCCATGGA
TAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
TGCCATCATGAGGCACATCTTGAGAGACCGGACCCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGT
TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGCTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTG
TGGATTATTTTGAACCGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTT
TGGACTCGATCTGGAATCCGCTCTATTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGG
GATAACTCCCCGTCGCTTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACC
CACAACCTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA
TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACAC
CCACAGAGTGACTTTTCTTCAATTCGTGAGCAAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTGGGGAAAAGT
TGTCCTGTCACAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGACACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGA
TTTAGGCATCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATAC
CATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATC
TGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATATTGG
TGCTATAGCGCGGAGTTCAAGTTTTCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTT
CTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTTCAACCTTGA
CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGGCAGGGGA
TATTGCCACGCGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTG
TGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGAC
TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGA
AGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
GTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACC
ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
GACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTG
ACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCA
CAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGA
AATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGC
ATGAGCAGTATTAGGTGCAAAATGCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTT
GCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTAC

Фиг. 4В

6/13

TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
ATATTGTTCTCACCGAAAGTGCTGCGTATATTTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGAAACACCACCGGTAG
ACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACCTTATAAC
CGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGT
TTGCTGTGAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTACGGGGCCGCTCTGTAT
CTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCT
GGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
TTTCTGGCGGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAA
GAACACCGTCACTTGCACCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAA
TAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTGGTCTCGAGA
ACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCTGTAG
CACAACAACAATGACGTTTGTATGCGGGTGACATCATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACA
ACAAAAATCAGTAAGGCAACCGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTAT
GCCCCGCGCTCGACCAAGAAAAAGAAGTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGCTA
ACAGAAGCAGATACAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGG
CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCCCTTTGTAT
TCATCTAGTGTGAACCGTGCTTTTCAAGCCCAAGGTGCGAGTGGAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAG
AGAACCTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGG
AGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCC
TATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCTTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAG
CTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTACGCAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTGGCGGCGCTTTAA
TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAAACCCATCAGG
CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAAATTAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTCGA
AGACACATAATTTGAATATGTGACGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGT
GAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCG
CTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCTGCTTCCGA
ACATTCATACACTGTTTGATATGTGCGCTGAAGACTTTGACGCTATATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGG
GGATTGTGTTCTGGAAGTACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTTCGGCGAAA
TTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTT
CACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACTTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGA
TCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAG
ACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCTTA
TTTCTGTGGAGGGTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAAAA
AGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGTC

Фиг. 4С

ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
TGAAACCGTAGGAACCTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGC
TACCTGAGAGGGGGCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCGACGCC
ACCATGGAAGTGTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCGTGACCTTCTGCTTCG
CCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAATTCTACCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAG
CGCCCTGCGGACCGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGTCCAACATCAAAGAAAAACAAGTGC
AACGGCACCGACGCCAAGGTGAAACTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGC
TGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCCGGTTCATGAA
CTACACCTGAAACAACGCCAAGAAAAACAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGTTCTTGGGC
TTCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGCGGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCG
AGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGTGTCCACCAACAAGGCGGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGAG
CGTGTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAG
CAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGAAAA
TCACCCGGGAGTTACGCGTGAACGCCGGCGTGACCAACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGA
GCTGTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAG
ATCGTGGCGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGC
TGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACAC
CAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGACCGACCGGGGTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTG
AGCTTCTTCCCCAAGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCC
TGACCCTGCCCTCCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCAT
GACCTCCAAGACCGACGTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAG
ACCAAGTGACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGA
GCAACAAGGGCGTGGACACCGTGAGCGTGGGCAACACACTGTACTACGTGAATAAGCAGGAAGGCAAGAG
CCTGTACGTGAAGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTCCCCAGCGACGAGTTCGAC
GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGC
TGCACAATGTGAATGCCGGCAAGAGCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATTTGT
GATCCTGCTGTCTCTGATTGCCGTGGGCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCCGCAGACCCCTGTGACCTG
TCCAAGGACCAGCTGTCCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAGTGAAGTCTAGACGGCGCGCCACCC
AGCGGCCGCATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGCGATTGGCATGCCGCTTAA
AATTTTATTTTATTTTCTTTCTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGA
AGGAGGACGCACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTTAAACCAGCTCCAATTCGCCCTATAG
TGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
CAACTTAATCGCCTTGAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
GCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGC

Фиг. 4D

GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
TTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTTC
CAAACCTGGAACAACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGG
CCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTAAACGCGAATTTAAACAAAATATTAACGCTTAC
AATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCTGTTTTTGCTCACCCA
GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATC
TCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACGCGCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
GCAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT
GATTAAGCATTTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTT
TAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTT
CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTACCAGT
GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCTTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTC
TCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGA

Фиг. 4Е

9/13

GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCT
CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA
AGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCACGCGTAATACGACTCACTA
TAG

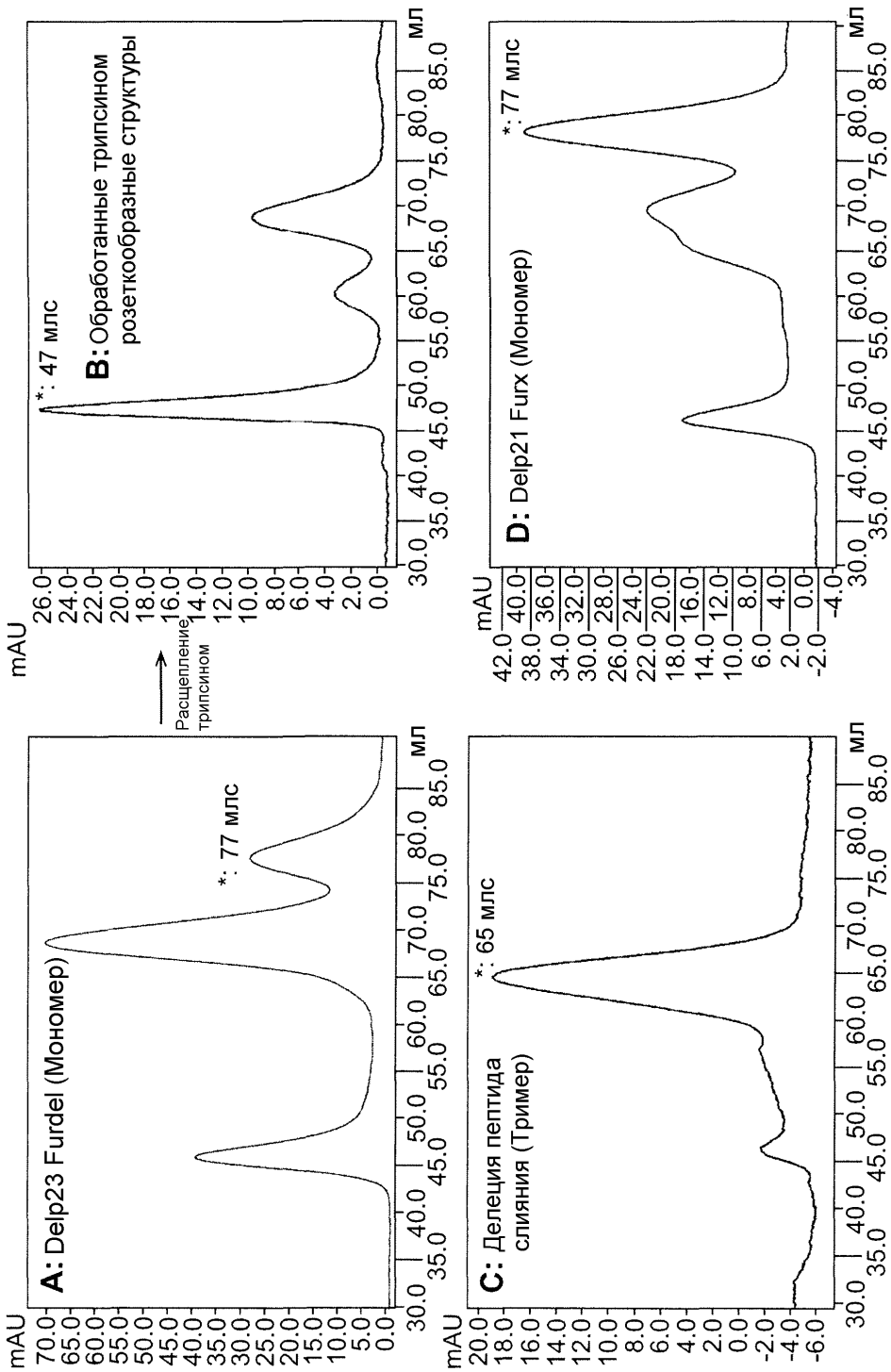
Фиг. 4F

10/13

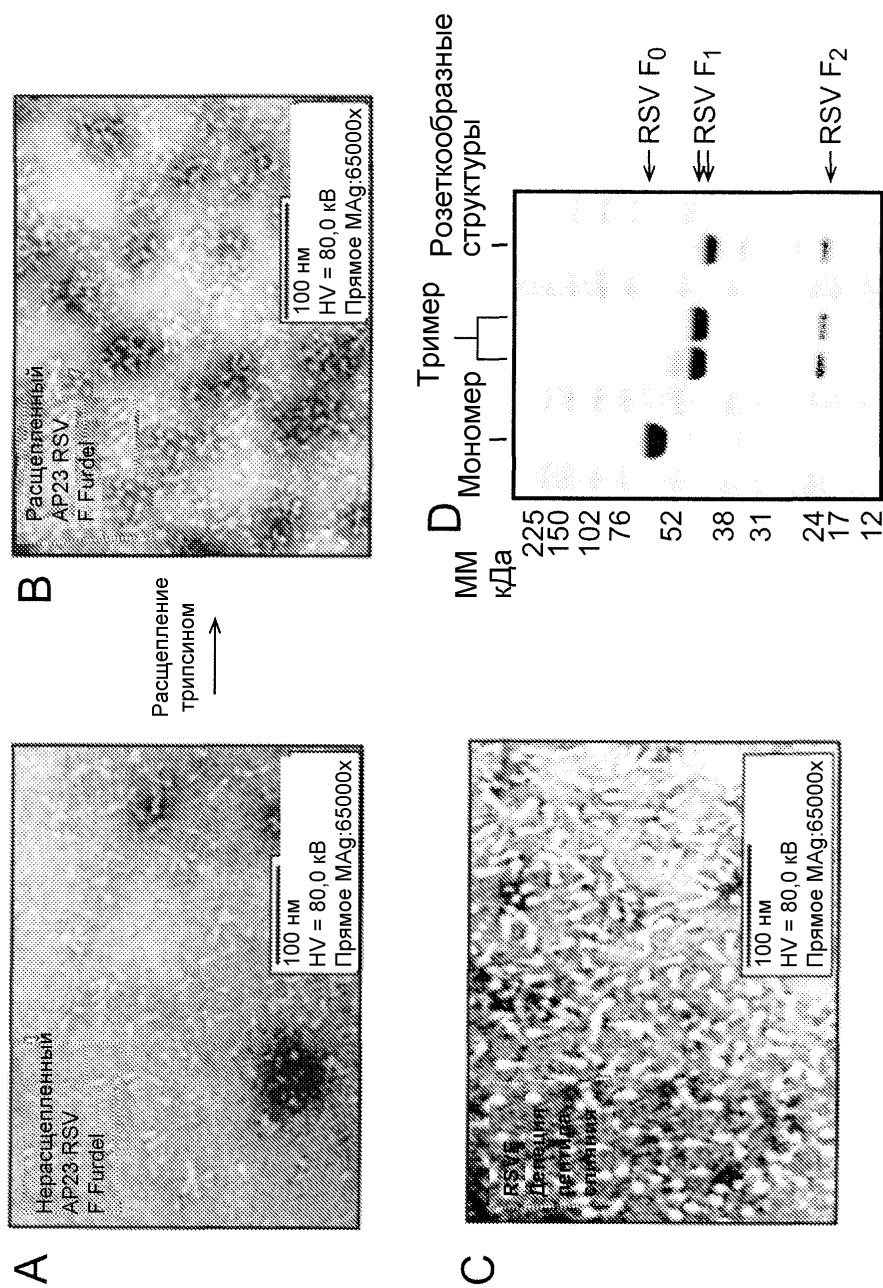
1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
CP52													
B													
Штамм 18537													
R2													
Long													
Консенсусная													
последовательность													
CP52													
B													
Штамм 18537													
R2													
Long													
Консенсусная													
последовательность													
CP52													
B													
Штамм 18537													
R2													
Long													
Консенсусная													
последовательность													
CP52													
B													
Штамм 18537													
R2													
Long													
Консенсусная													
последовательность													

Фиг. 5

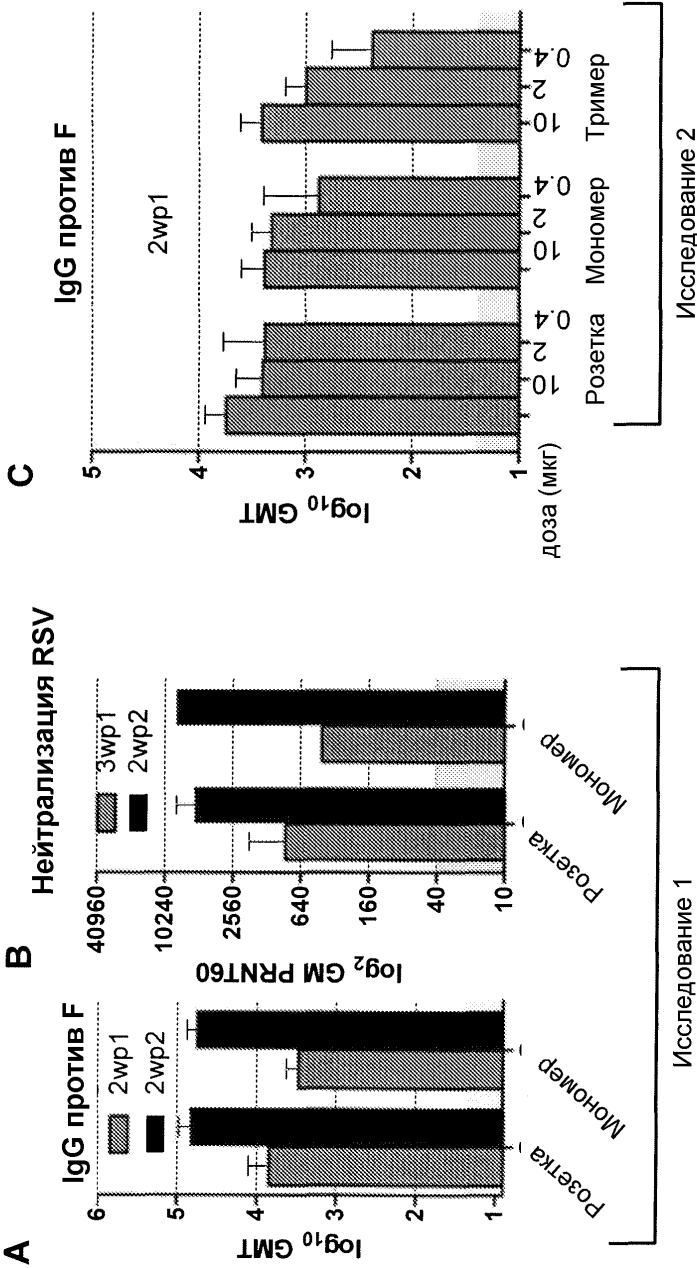
Фиг. 6: Типичные хроматограммы для очистки способом SEC выбранных антигенов F RSV



Фиг. 7: Анализ посредством EM и SDS-PAGE антигенов F RSV



Фиг. 8: Иммуногенность субъединиц RSV-F у хлопковых хомячков



СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SWANSON, KURT
DORMITZER, PHILIP R.

<120> КОМПОЗИЦИИ БЕЛКА F RSV И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

<130> PAT053705-US-PCT

<140> 13383897

<141> 2012-03-06

<150> PCT/US2010/042161

<151> 2010-07-15

<150> 61/294,426

<151> 2010-01-12

<150> 61/225,805

<151> 2009-07-15

<160> 112

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 1

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val

130		135		140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
145		150	155	160
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys				
	165		170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val				
	180	185		190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn				
	195	200	205	
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln				
	210	215	220	
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn				
225		230	235	240
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu				
	245	250		255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys				
	260	265		270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile				
	275	280	285	
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro				
	290	295	300	
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
305		310	315	320
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg				
	325	330		335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe				
	340	345		350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp				
	355	360	365	
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Ile Asn Leu Cys Asn Val				
	370	375	380	
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr				
385		390	395	400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Met Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

<210> 2

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Val Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile

50		55		60
Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys				
65		70		75 80
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu				
	85		90	95
Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro				
	100		105	110
Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser				
	115		120	125
Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val				
	130		135	140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
	145		150	155 160
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys				
	165		170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val				
	180		185	190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn				
	195		200	205
Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln				
	210		215	220
Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn				
	225		230	235 240
Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu				
	245		250	255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys				
	260		265	270
Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile				
	275		280	285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro				
	290		295	300
Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
	305		310	315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
565 570

<210> 3
 <211> 51
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

 <400> 3
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Lys Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

 Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

 Lys Arg Lys Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

 Ile Ala Ser
 50

<210> 4
 <211> 48
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

 <400> 4
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

 Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

 Lys Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 35 40 45

<210> 5
 <211> 51
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

 <400> 5
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
 1 5 10 15

 Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
 20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 6
 <211> 51
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид

<400> 6
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
 20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 7
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид

<400> 7
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln Asn Gln Asn
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 20 25 30

<210> 8
 <211> 28
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 пептид

<400> 8
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu

1 5 10 15

Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25

<210> 9

<211> 28

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 9

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln Arg Phe Leu
1 5 10 15

Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
20 25

<210> 10

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 10

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Ser
50

<210> 11

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 11

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 12

<211> 42

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 12

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser
 35 40

<210> 13

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 13

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Ile Glu Gly Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Ile Glu Gly Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 14

<211> 64

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 14

Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Val
1				5				10				15			

Asn	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Asp	Glu
			20					25					30		

Leu	Leu	His	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ile
			35				40					45			

Tyr	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu
	50					55					60				

<210> 15

<211> 60

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 15

Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Val
1				5				10				15			

Asn	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Asp	Glu
			20					25					30		

Leu	Leu	His	Asn	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe
			35				40					45			

Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
	50					55					60

<210> 16

<211> 38

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 16

Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Ile
1				5				10				15			

Asn	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ile	Leu	Ala	Phe	Ile	Arg	Lys	Ile	Asp	Glu
			20					25					30		

Leu Leu His Asn Ile Asn
35

<210> 17

<211> 67

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 17

Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg
35 40 45

Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser
50 55 60

Thr Phe Leu
65

<210> 18

<211> 73

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 18

Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val
1 5 10 15

Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu
20 25 30

Leu Leu His Asn Val Asn Asn Lys Asn Asp Asp Lys Gly Ser Gly Tyr
35 40 45

Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly
50 55 60

Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
65 70

<210> 19

<211> 29

<212> Белок

<213> Неизвестно

<220>

<223> Описание неизвестного: последовательность фибритина
Бактериофага T4

<400> 19

Gly	Ser	Gly	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Asp	Gly	Gln	Ala	Tyr	Val
1				5				10					15		

Arg	Lys	Asp	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Leu	Ser	Thr	Phe	Leu
			20				25					

<210> 20

<211> 31

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид

<400> 20

Lys	Gln	Ile	Glu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ile	Tyr	His
1				5				10					15		

Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala
			20				25					30		

<210> 21

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 21

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr
1				5				10					15		

Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20				25					30			

Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
			35				40					45			

Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
			50			55				60					

Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70				75				80		

Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
			85				90						95		

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp

355	360	365	
Thr Met Asn Ser Leu Thr	Leu Pro Ser Glu Val	Asn Leu Cys Asn Val	
370	375	380	
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr	Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr		
385	390	395	400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys			
	405	410	415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile			
	420	425	430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp			
	435	440	445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly			
	450	455	460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro			
	465	470	475
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn			
	485	490	495
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu			
	500	505	510
Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr			
	515	520	525
Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val			
	530	535	540
Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser			
	545	550	555
Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn			
	565	570	
<210> 22			
<211> 1727			
<212> ДНК			
<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека			
<400> 22			
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tctgaccgc cgtgaccttc			60
tgcttcgccca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg			120

agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180
 ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240
 caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300
 cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360
 aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctggggcttc 420
 ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg 480
 gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540
 ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac 600
 aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660
 atcgagtccc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720
 gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780
 atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840
 gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900
 gtgcagctgc cctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc 960
 ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc 1020
 tgggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg 1080
 cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140
 ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200
 gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260
 aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320
 tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380
 aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440
 ctgggtgttc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500
 cagagcctgg ccttcacccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560
 agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620
 ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc 1680
 aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca actgaag 1727

<210> 23

<211> 588

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 23

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys

260	265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile 275 280 285		
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro 290 295 300		
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro 305 310 315 320		
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg 325 330 335		
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe 340 345 350		
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp 355 360 365		
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val 370 375 380		
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr 385 390 395 400		
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys 405 410 415		
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile 420 425 430		
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp 435 440 445		
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly 450 455 460		
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro 465 470 475 480		
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn 485 490 495		
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu 500 505 510		
Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr 515 520 525		

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Ser Gly
565 570 575

Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
580 585

<210> 24

<211> 1769

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид

<400> 24

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac	360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctgggcttc	420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac	720
gccggcgctga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg	900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc	1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaaggtg	1080
cagagcaacc ggggtgtctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac	1140

```

ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440
ctgggtgttc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500
cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560
agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct 1620
ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgcg gcaccctgtg gaccctgtcc 1680
aaggaccagc tgtccggcat caacaatcgc gccttctcca acagcggcgg cagcgccggc 1740
tctggccacc accaccatca ccaactgaag 1769

```

<210> 25

<211> 624

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 25

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1           5           10           15

```

```

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
          20           25           30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
      35           40           45

```

```

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
      50           55           60

```

```

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65           70           75           80

```

```

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
      85           90           95

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
      100          105          110

```

```

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
      115          120          125

```

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Gly Ser
565 570 575

Ser Gly Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
580 585 590

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
595 600 605

Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
610 615 620

<210> 26

<211> 1877

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 26

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcttgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgcca ggggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac	360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctgggcttc	420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggaggt cagcgtgaac	720
gccggcgtga ccaccccggt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg	900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc	1020
tgggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg	1080
cagagcaacc ggggtgtctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac	1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc	1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgcatcg tgagctgcta cggcaagacc	1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac	1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat	1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc	1440
ctgggtgtcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac	1500
cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag	1560
agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct	1620
ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcacccctgt gaccctgtcc	1680
aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acggcagcag cggccggatg	1740
aagcagatcg aggacaagat cgaggaaatc ctgagcaaga tctaccacat cgagaacgag	1800

atcgcccgga tcaagaagct gatcggcgaa agcggcggct ctgccggaag cggccaccac 1860
 caccatcacc actgaag 1877

<210> 27

<211> 626

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 27

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Gly Ser
565 570 575

Ser Gly Ser Gly Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile
580 585 590

Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys
595 600 605

Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
610 615 620

His His
625

<210> 28

<211> 1883

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 28

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgcca gcgccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300

```

ccccccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac      360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctgggcttc      420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg      480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc      540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac      600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg      660
atcgagtccc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac      720
gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg      780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc      840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg      900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc     1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg     1080
cagagcaacc ggggtgttct cgacaccatg aacagcctga cctgcccctc cgaggtgaac     1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc     1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc     1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac     1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat     1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc     1440
ctgggtgttc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac     1500
cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag     1560
agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct     1620
ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc     1680
aaggaccagc tgtccggcat caacaatcgc gccttctcca acggcagcag cggcagcggc     1740
cggatgaagc agatcgagga caagatcgag gaaatcctga gcaagatcta ccacatcgag     1800
aacgagatcg cccgatcaa gaagctgacg ggcgaaagcg gcggtctctg cggaagcggc     1860
caccaccacc atcaccactg aag                                             1883

```

<210> 29

<211> 531

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 29

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys

260	265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile 275 280 285		
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro 290 295 300		
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro 305 310 315 320		
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg 325 330 335		
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe 340 345 350		
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp 355 360 365		
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val 370 375 380		
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr 385 390 395 400		
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys 405 410 415		
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile 420 425 430		
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp 435 440 445		
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly 450 455 460		
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro 465 470 475 480		
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn 485 490 495		
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu 500 505 510		
Leu His Asn Val Asn Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His 515 520 525		

His His His
530

<210> 30
<211> 1598
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полинуклеотид

<400> 30
atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60
tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180
ctgtccaaca tcaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300
cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggg tcatgaacta caccctgaac 360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420
ctgctggggc tgggcagcgc catcgccagc ggggtggcgg tgtccaaggt gctgcacctg 480
gaagcgcagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540
ctgagcaacg gctgtgagct gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac 600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660
atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720
gccggcgtga cccccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg 900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc 960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc 1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaaggtg 1080
cagagcaacc ggggtgtctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac 1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440
ctgggtgtcc ccagcgacga gtgcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500

cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tagcggcggc 1560
 agcgccggct ctggccacca ccaccatcac cactgaag 1598

<210> 31

<211> 557

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 31

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn

195	200	205
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln 210 215 220		
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn 225 230 235 240		
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu 245 250 255		
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys 260 265 270		
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile 275 280 285		
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro 290 295 300		
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro 305 310 315 320		
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg 325 330 335		
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe 340 345 350		
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp 355 360 365		
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val 370 375 380		
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr 385 390 395 400		
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys 405 410 415		
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile 420 425 430		
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp 435 440 445		
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly 450 455 460		

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
515 520 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
530 535 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
545 550 555

<210> 32

<211> 1676

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 32

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgccca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac	360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctgggcttc	420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac	720
gccggcgatga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg	900

```

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc      1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttccccc aagccgagac ctgcaaggtg      1080
cagagcaacc ggggtgtctg cgacaccatg aacagcctga cctgccctc cgaggtgaac      1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc      1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc      1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac      1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat      1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc      1440
ctgggtgttc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac      1500
cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgacaagatc      1560
gaggaaatcc tgagcaagat ctaccacatc gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg      1620
atcggcgaaa gcggcggctc tgccggaagc ggccaccacc accatcacca ctgaag      1676

```

<210> 33

<211> 615

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 33

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1           5           10           15

```

```

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
          20           25           30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
          35           40           45

```

```

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
          50           55           60

```

```

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65           70           75           80

```

```

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
          85           90           95

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
          100          105          110

```

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

35

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Gly Ser
 565 570 575

Ser Gly Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val
 580 585 590

Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser
 595 600 605

Gly His His His His His His
 610 615

<210> 34

<211> 1850

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 34

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgcca gcgccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcgacc ggctgtgaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaaagaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300
cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac	360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc	420
ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggcgg tgtccaaggt gctgcacctg	480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgcc	540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac	600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg	660
atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac	720
gccccgctga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg	780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc	840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggctacgtg	900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc	960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc	1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg	1080
cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgagggtgaac	1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc	1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc	1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac	1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat	1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc	1440
ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac	1500
cagagcctgg ccttcacccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag	1560
agcaccacca atatcatgat caccacaatc atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct	1620
ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc	1680

aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc gccttctcca acggcagcag cggcaatgag 1740
aagttccacc agatcgagaa agaattcagc gaggtggagg gccggatcca ggacctggaa 1800
aagagcggcg gctctgccgg aagcggccac caccaccatc accactgaag 1850

<210> 35

<211> 553

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 35

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly

450					455					460					
Lys	Ser	Leu	Tyr	Val	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Ile	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro
465					470					475					480
Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Val	Asn
				485					490					495	
Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu
			500					505					510		
Leu	His	Asn	Val	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe	Ser
		515					520					525			
Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala
	530					535					540				
Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His							
545					550										

<210>	36
<211>	1664
<212>	ДНК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

[illegible]

```

gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg      900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc     1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaaggtg     1080
cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac     1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc     1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc     1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac     1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat     1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc     1440
ctgggtgttc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac     1500
cagagcctgg ccttcacccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgagaagttc     1560
caccagatcg agaaagaatt cagcgaggtg gagggccgga tccaggacct ggaaaagagc     1620
ggcggctctg ccggaagcgg ccaccaccac catcaccact gaag                        1664

```

<210> 37

<211> 534

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 37

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1           5           10           15

```

```

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
          20           25           30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
          35           40           45

```

```

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
          50           55           60

```

```

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65           70           75           80

```

```

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
          85           90           95

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
          100          105          110

```

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile
 465 470 475 480

Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
 485 490 495

Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
 500 505 510

Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn Met Gly Gly Ser
 515 520 525

His His His His His His
 530

<210> 38

<211> 1607

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид

<400> 38

atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc	60
tgcttcgccca ggggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg	120
agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag	240
caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc	300

```

cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac      360
aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcgggt cctgggcttc      420
ctgctggggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggccg tgtccaaggt gctgcacctg      480
gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc      540
ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac      600
aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg      660
atcagagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac      720
gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg      780
atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc      840
gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggcctacgtg      900
gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc      960
ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgacccggac cgaccggggc     1020
tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg     1080
cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgaggtgaac     1140
ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc     1200
gacgtgagca gctccgtgat cacctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc     1260
aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac     1320
tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat     1380
aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca atatcatgat caccacaatc     1440
atcatcgtga tcattgtgat cctgctgtct ctgattgccg tgggcctgct gctgtactgc     1500
aaggcccgca gcaccctgt gaccctgtcc aaggaccagc tgtccggcat caacaatatc     1560
gccttctcca acatgggggg ttctcatcat catcatcatc attgaag                      1607

```

<210> 39

<211> 524

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 39

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1              5              10              15

```

```

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
                20              25              30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35              40              45

```

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
 515 520

<210> 40

<211> 1577

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полинуклеотид

<400> 40
 atggaactgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc 60
 tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg 120
 agcaagggct acctgagcgc cctgcggacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag 180
 ctgtccaaca tcaaagaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag 240
 caggaactgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc 300
 cccgccacca acaaccgggc cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac 360
 aacgccaaga aaaccaacgt gaccctgagc aagaagcgga agcggcggtt cctgggcttc 420
 ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggggtggcgg tgtccaaggt gctgcacctg 480
 gaaggcgagg tgaacaagat caagtccgcc ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc 540
 ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aagggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac 600
 aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg 660
 atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg ctggaaatca cccgggagtt cagcgtgaac 720
 gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgtccctg 780
 atcaatgaca tgcccatcac caacgaccag aaaaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc 840
 gtgcggcagc agagctactc catcatgagc atcatcaaag aagaggtgct ggctacgtg 900
 gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc 960
 ctgtgcacca ccaacaccaa agagggcagc aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc 1020
 tggtagctgc acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aagccgagac ctgcaagggtg 1080
 cagagcaacc ggggtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgccctc cgagggtgaa 1140
 ctgtgcaacg tggacatctt caacccaag tacgactgca agatcatgac ctccaagacc 1200
 gacgtgagca gctccgtgat caccctccctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc 1260
 aagtgcaccg ccagcaacaa gaaccggggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac 1320
 tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acacactgta ctacgtgaat 1380
 aagcaggaag gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc 1440
 ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtcaacga gaagatcaac 1500
 cagagcctgg ccttcatccg gaagagcgac gagctgctgc acaatgtgaa tgccggcaag 1560
 agcaccacca attgaag 1577

<210> 41

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 41

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30
 Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

<210> 42

<211> 590

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 42

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

51

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Ile Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser
 515 520 525

Gly Asp Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr
 530 535 540

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 545 550 555 560

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 565 570 575

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 580 585 590

<210> 43

<211> 588

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 43

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Ile Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser
515 520 525

Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr Thr Ile
530 535 540

Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
545 550 555 560

Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
565 570 575

Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn

580

585

<210> 44

<211> 588

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 44

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

55

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro

56

465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Ile Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser
515 520 525

Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Ser Gly Ile Met Ile Thr Thr Ile
530 535 540

Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu
545 550 555 560

Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp
565 570 575

Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
580 585

<210> 45
<211> 537
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 45
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15
Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30
Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45
Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60
Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp

58

355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525
 Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535
 <210> 46
 <211> 537
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид
 <400> 46
 Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110
 Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro

60

290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525
 Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 47

<211> 516

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 47

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
 100 105 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
 115 120 125

Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn
 130 135 140

Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu
 145 150 155 160

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
 165 170 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
 180 185 190

Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg
 195 200 205

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile

62

225		230		235		240
Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn						
	245			250		255
Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys						
	260			265		270
Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile						
	275			280		285
Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn						
	290			295		300
Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp						
305		310		315		320
Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr						
	325			330		335
Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu						
	340			345		350
Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro						
	355			360		365
Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser						
	370			375		380
Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys						
385		390		395		400
Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn						
	405			410		415
Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly						
	420			425		430
Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val						
	435			440		445
Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser						
	450			455		460
Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln						
465		470		475		480
Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn						
	485			490		495

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His
 500 505 510

His His His His
 515

<210> 48

<211> 514

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 48

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
 100 105 110

Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
 115 120 125

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile
 130 135 140

Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn
 145 150 155 160

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
 165 170 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser

180	185	190
Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu		
195	200	205
Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val		
210	215	220
Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp		
225	230	235 240
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln		
245	250	255
Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu		
260	265	270
Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr		
275	280	285
Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys		
290	295	300
Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys		
305	310	315 320
Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys		
325	330	335
Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu		
340	345	350
Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr		
355	360	365
Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile		
370	375	380
Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr		
385	390	395 400
Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys		
405	410	415
Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr		
420	425	430
Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly		
435	440	445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
500 505 510

His His

<210> 49

<211> 514

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 49

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile

130		135		140
Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn				
145		150		155 160
Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile				
	165		170	175
Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser				
	180		185	190
Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu				
	195		200	205
Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val				
	210		215	220
Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp				
	225	230		235 240
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln				
	245		250	255
Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu				
	260		265	270
Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr				
	275		280	285
Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys				
	290		295	300
Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys				
	305	310		315 320
Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys				
	325		330	335
Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu				
	340		345	350
Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr				
	355		360	365
Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile				
	370		375	380
Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr				
	385	390		395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
 405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
 420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
 435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
 450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
 465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
 485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His
 500 505 510

His His

<210> 50

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 50

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu

68

95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Lys Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 51

<211> 534

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 51

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe

RU 2 585 227 C2

70

30'

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu
145 150 155 160

Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val
165 170 175

Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu
180 185 190

Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser
195 200 205

Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn
210 215 220

```
Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val  
225                230                235                240
```

Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser
245 250 255

Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser
260 265 270

Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile
275 280 285

Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly
 290 295 300

Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr
 305 310 315 320

Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg
 325 330 335

Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala
 340 345 350

Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn
 355 360 365

Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe
 370 375 380

Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys
 405 410 415

Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe
 420 425 430

Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser
 435 440 445

Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu
 450 455 460

Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe
 465 470 475 480

Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile
 485 490 495

Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn
 500 505 510

Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
 515 520 525

His His His His His His
 530

<210> 52

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 52

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Ile Glu Gly Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Ile Glu Gly Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 53

<211> 566

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 53

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Tyr
 515 520 525

Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly
 530 535 540

Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
 545 550 555 560

His His His His His His
 565

<210> 54

<211> 572

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 54

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510
 Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Asn Lys Asn Asp
 515 520 525
 Asp Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala
 530 535 540
 Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly
 545 550 555 560
 Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
 565 570

<210> 55

<211> 557

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 55

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

81

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
 515 520 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
 530 535 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
 545 550 555

<210> 56

<211> 553

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 56

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
515 520 525

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Ser Gly Gly Ser Ala
530 535 540

Gly Ser Gly His His His His His His
545 550

<210> 57

<211> 557

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 57

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110
 Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
515 520 525

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser
530 535 540

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
545 550 555

<210> 58

<211> 536

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 58

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
 100 105 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
 115 120 125

Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn
 130 135 140

Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu
 145 150 155 160

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
 165 170 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
 180 185 190

Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg
 195 200 205

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile
 225 230 235 240

Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
 245 250 255
 Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys
 260 265 270
 Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile
 275 280 285
 Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn
 290 295 300
 Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp
 305 310 315 320
 Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr
 325 330 335
 Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu
 340 345 350
 Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro
 355 360 365
 Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
 370 375 380
 Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
 385 390 395 400
 Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
 405 410 415
 Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly
 420 425 430
 Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
 435 440 445
 Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
 450 455 460
 Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln
 465 470 475 480
 Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn
 485 490 495
 Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu

88

500										505										510									
Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly														
		515					520					525																	
Ser	Gly	His	His	His	His	His	His																						
	530					535																							
<210> 59																													
<211> 534																													
<212> Белок																													
<213> Искусственная последовательность																													
<220>																													
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид																													
<400> 59																													
Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr														
1			5					10						15															
Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe														
			20					25					30																
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu														
		35					40					45																	
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile														
	50					55					60																		
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys														
65					70					75				80															
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu														
				85					90					95															
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Asn	Gln														
			100					105					110																
Asn	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly														
		115					120					125																	
Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile														
	130					135					140																		
Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn														
145					150					155					160														
Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile														
				165					170					175															

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
180 185 190

Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu
195 200 205

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
210 215 220

Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp
225 230 235 240

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
245 250 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
260 265 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
275 280 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
290 295 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
305 310 315 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
325 330 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
340 345 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
355 360 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385 390 395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly

90

435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
485 490 495

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
500 505 510

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 60
<211> 534
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
полипептид

<400> 60
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
 115 120 125
 Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile
 130 135 140
 Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn
 145 150 155 160
 Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
 165 170 175
 Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
 180 185 190
 Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu
 195 200 205
 Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
 210 215 220
 Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp
 225 230 235 240
 Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
 245 250 255
 Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
 260 265 270
 Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
 275 280 285
 Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
 290 295 300
 Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
 325 330 335
 Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
 340 345 350
 Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
 355 360 365
 Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile

370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
385 390 395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
485 490 495

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
500 505 510

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ser Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly
515 520 525

His His His His His His
530

<210> 61
<211> 574
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 61
Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro

305		310		315		320
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg		325		330		335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe		340		345		350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp		355		360		365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val		370		375		380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr		385		390		400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys		405		410		415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile		420		425		430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp		435		440		445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly		450		455		460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro		465		470		475
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn		485		490		495
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu		500		505		510
Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr		515		520		525
Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val		530		535		540
Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser		545		550		555
Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn		565		570		

<210> 62

<211> 553

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 62

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
 100 105 110

Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala
 115 120 125

Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn
 130 135 140

Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu
 145 150 155 160

Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn
 165 170 175

Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser
 180 185 190

Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg
 195 200 205

Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr

210					215					220					
Pro 225	Val	Ser	Thr	Tyr	Met 230	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu 235	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile 240
Asn	Asp	Met	Pro	Ile 245	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys 250	Lys	Leu	Met	Ser	Asn 255	Asn
Val	Gln	Ile	Val 260	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr 265	Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile 270	Lys
Glu	Glu	Val 275	Leu	Ala	Tyr	Val	Val 280	Gln	Leu	Pro	Leu	Tyr 285	Gly	Val	Ile
Asp	Thr 290	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu 295	His	Thr	Ser	Pro	Leu 300	Cys	Thr	Thr	Asn
Thr 305	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn 310	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg 315	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp 320
Tyr	Cys	Asp	Asn 325	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe 330	Phe	Pro	Gln	Ala	Glu 335	Thr
Cys	Lys	Val 340	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe 345	Cys	Asp	Thr	Met	Asn 350	Ser	Leu
Thr	Leu 355	Pro	Ser	Glu	Val	Asn 360	Leu	Cys	Asn	Val	Asp	Ile 365	Phe	Asn	Pro
Lys	Tyr 370	Asp	Cys	Lys	Ile	Met 375	Thr	Ser	Lys	Thr	Asp 380	Val	Ser	Ser	Ser
Val 385	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly 390	Ala	Ile	Val	Ser	Cys 395	Tyr	Gly	Lys	Thr	Lys 400
Cys	Thr	Ala	Ser	Asn 405	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile 410	Ile	Lys	Thr	Phe	Ser 415	Asn
Gly	Cys	Asp	Tyr 420	Val	Ser	Asn	Lys	Gly 425	Val	Asp	Thr	Val	Ser 430	Val	Gly
Asn	Thr 435	Leu	Tyr	Tyr	Val	Asn 440	Lys	Gln	Glu	Gly	Lys	Ser 445	Leu	Tyr	Val
Lys	Gly 450	Glu	Pro	Ile	Ile	Asn 455	Phe	Tyr	Asp	Pro	Leu 460	Val	Phe	Pro	Ser
Asp 465	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser 470	Ile	Ser	Gln	Val	Asn 475	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln 480

Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn
 485 490 495

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val
 500 505 510

Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr
 515 520 525

Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser
 530 535 540

Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 545 550

<210> 63

<211> 551

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 63

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Gln Asn Gln
 100 105 110

Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
 115 120 125

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile

130		135		140
Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn				
145		150	155	160
Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile				
	165		170	175
Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser				
	180	185		190
Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu				
	195	200		205
Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val				
	210	215		220
Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp				
	225	230	235	240
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln				
	245	250		255
Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu				
	260	265		270
Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr				
	275	280		285
Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys				
	290	295	300	
Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys				
	305	310	315	320
Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys				
	325	330		335
Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu				
	340	345		350
Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr				
	355	360	365	
Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile				
	370	375	380	
Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr				
	385	390	395	400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
 405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
 420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
 435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
 450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
 465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
 485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile
 500 505 510

Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys
 515 520 525

Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile
 530 535 540

Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 545 550

<210> 64

<211> 551

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 64

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile

100

50		55		60	
Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys					
65		70		75	80
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu					
	85		90		95
Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln					
	100		105		110
Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly					
	115		120		125
Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile					
	130		135		140
Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn					
	145		150		155
Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile					
	165		170		175
Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser					
	180		185		190
Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu					
	195		200		205
Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val					
	210		215		220
Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp					
	225		230		235
Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln					
	245		250		255
Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu					
	260		265		270
Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr					
	275		280		285
Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys					
	290		295		300
Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys					
	305		310		315
					320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
 325 330 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
 340 345 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
 355 360 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
 370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
 385 390 395 400

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
 405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
 420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
 435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
 450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
 465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
 485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile
 500 505 510

Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys
 515 520 525

Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile
 530 535 540

Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 545 550

<210> 65
 <211> 537
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 65

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 66

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 66

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 67

<211> 528

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 67

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala
 130 135 140
 Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser
 145 150 155 160
 Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val
 165 170 175
 Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys
 180 185 190
 Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile
 195 200 205
 Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile
 210 215 220
 Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr
 225 230 235 240
 Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro
 245 250 255
 Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val
 260 265 270
 Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu
 275 280 285
 Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys
 290 295 300
 Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly
 305 310 315 320
 Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn
 325 330 335
 Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln
 340 345 350
 Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser
 355 360 365

108

Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys
 370 375 380

Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser
 385 390 395 400

Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser
 405 410 415

Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr
 420 425 430

Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr
 435 440 445

Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro
 450 455 460

Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp
 465 470 475 480

Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe
 485 490 495

Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser
 500 505 510

Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
 515 520 525

<210> 68

<211> 531

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 68

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110
 Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 130 135 140
 Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys
 145 150 155 160
 Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser
 165 170 175
 Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr
 180 185 190
 Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile
 195 200 205
 Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu
 210 215 220
 Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro
 225 230 235 240
 Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn
 245 250 255
 Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val
 260 265 270
 Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu
 275 280 285
 Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp
 290 295 300
 Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr
 305 310 315 320

110

Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr
 325 330 335

Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys
 340 345 350

Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr
 355 360 365

Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys
 370 375 380

Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val
 385 390 395 400

Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys
 405 410 415

Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly
 420 425 430

Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn
 435 440 445

Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys
 450 455 460

Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp
 465 470 475 480

Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser
 485 490 495

Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala
 500 505 510

Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His
 515 520 525

His His His
 530

<210> 69

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

111

<400> 69

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

113

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 70

<211> 524

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 70

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

115

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn
515 520

<210> 71

<211> 501

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 71

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Gln Gln
100 105 110

Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly
115 120 125

Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile
130 135 140

Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn
 145 150 155 160

Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile
 165 170 175

Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser
 180 185 190

Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu
 195 200 205

Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val
 210 215 220

Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp
 225 230 235 240

Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln
 245 250 255

Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu
 260 265 270

Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr
 275 280 285

Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys
 290 295 300

Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys
 305 310 315 320

Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys
 325 330 335

Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu
 340 345 350

Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr
 355 360 365

Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile
 370 375 380

Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr
 385 390 395 400

117

Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys
405 410 415

Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr
420 425 430

Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly
435 440 445

Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu
450 455 460

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
465 470 475 480

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly
485 490 495

Lys Ser Thr Thr Asn
500

<210> 72

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
праймер

<400> 72

ttggatctgc aatcgcca

18

<210> 73

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
праймер

<400> 73

cttttgatct tgttcacttc tccttct

27

<210> 74

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический
зонд

<400> 74

tggcactgct gtatctaagg tcctgcact

29

<210> 75
<211> 4
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 75
Leu Val Pro Arg
1

<210> 76
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 76
Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 77
<211> 4
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 77
Arg Ala Arg Lys
1

<210> 78
<211> 4
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 78
Arg Ala Arg Gln
1

<210> 79
<211> 4
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический

пептид

<400> 79

Gln Ala Gln Asn

1

<210> 80

<211> 4

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 80

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 81

<211> 4

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 81

Arg Lys Lys Lys

1

<210> 82

<211> 4

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 82

Gln Asn Gln Asn

1

<210> 83

<211> 4

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 83

Gln Gln Gln Arg

1

<210> 84

<211> 537

120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 84

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn

121

225		230		235		240
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu						
		245		250		255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys						
		260		265		270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile						
		275		280		285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro						
		290		295		300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro						
305		310		315		320
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg						
		325		330		335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe						
		340		345		350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp						
		355		360		365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val						
		370		375		380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr						
385		390		395		400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys						
		405		410		415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile						
		420		425		430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp						
		435		440		445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly						
		450		455		460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro						
465		470		475		480
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn						
		485		490		495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 85

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 85

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys

123

165	170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val		
180	185	190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn		
195	200	205
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln		
210	215	220
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn		
225	230	235
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu		
245	250	255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys		
260	265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile		
275	280	285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro		
290	295	300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro		
305	310	315
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg		
325	330	335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe		
340	345	350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp		
355	360	365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val		
370	375	380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr		
385	390	395
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys		
405	410	415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile		
420	425	430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
530 535

<210> 86

<211> 516

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 86

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Asn Gln

125

100					105					110					
Gln	Gln	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala
		115					120					125			
Ser	Gly	Val	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn
	130					135					140				
Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu
145					150					155					160
Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn
				165					170					175	
Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser
			180					185					190		
Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg
		195					200					205			
Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr
	210					215					220				
Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile
225					230					235					240
Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn
				245					250					255	
Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile	Lys
			260					265					270		
Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Ile
		275					280					285			
Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Thr	Thr	Asn
	290					295					300				
Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp
305					310					315					320
Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Pro	Gln	Ala	Glu	Thr
				325					330					335	
Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp	Thr	Met	Asn	Ser	Leu
			340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val	Asp	Ile	Phe	Asn	Pro
		355					360					365			

Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser
370 375 380

Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys
385 390 395 400

Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn
405 410 415

Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly
420 425 430

Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val
435 440 445

Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser
450 455 460

Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln
465 470 475 480

Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn
485 490 495

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His
500 505 510

His His His His
515

<210> 87

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 87

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile

127

50		55		60
Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys				
65		70		75 80
Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu				
	85		90	95
Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro				
	100		105	110
Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr				
	115		120	125
Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val				
	130		135	140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
	145		150 155	160
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys				
	165		170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val				
	180		185	190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn				
	195		200	205
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln				
	210		215	220
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn				
	225		230 235	240
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu				
	245		250	255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys				
	260		265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile				
	275		280	285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro				
	290		295	300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
	305		310 315	320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 88

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический

ПОЛИПЕПТИД

<400> 88

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Gln
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Asn Asn Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

131

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 89

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 89

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

133

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Gly Gly Ser Ala
 515 520 525

Gly Ser Gly His His His His His His
 530 535

<210> 90

<211> 13

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 90

Gly Gly Ser Ala Gly Ser Gly His His His His His His
 1 5 10

<210> 91

<211> 45

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 91

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 35 40 45

<210> 92

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 92

Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro Gln Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr Leu Ser Gln
 20 25 30

Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 93

<211> 537

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 93

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Gln Ala Gln Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Gln Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Gln Gln Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Gln Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val

135

130		135		140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu				
145		150	155	160
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys				
	165		170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val				
	180		185	190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn				
	195		200	205
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln				
	210		215	220
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn				
	225		230	235
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu				
		245	250	255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys				
	260		265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile				
	275		280	285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro				
	290		295	300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
	305		310	315
Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg				
		325	330	335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe				
	340		345	350
Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp				
	355		360	365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val				
	370		375	380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr				
	385		390	395
				400

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

137

<400> 95

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Ile
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His His Ile Asn Ala Gly
 20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Gly
 35 40 45

Ser Gly Ser Gly
 50

<210> 96

<211> 71

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 96

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Asp Lys
 20 25 30

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
 35 40 45

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Gly Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp
 50 55 60

Asp Lys Gly Ser Gly Ser Gly
 65 70

<210> 97

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 97

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His His Ile Asn Ala Gly
 20 25 30

138

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser
 35 40 45

Gly Ser Gly
 50

<210> 98

<211> 70

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 98

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His His Val Asn Asp Lys
 20 25 30

Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala
 35 40 45

Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ile Glu Gly
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 65 70

<210> 99

<211> 51

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 99

Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Ile Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ile Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Arg Lys Ile Asp Glu Leu Leu His Asn Ile Asn Ala Gly
 20 25 30

Lys Ser Thr Thr Asn Gly Ser Gly Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
 35 40 45

Gly Ser Gly
 50

<210> 100

<211> 70

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 100

Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Val	Asn	Glu	Lys	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu
1				5				10					15		

Ala	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Asp	Glu	Leu	Leu	His	Asn	Val	Asn	Asp	Lys
			20					25					30		

Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ile	Tyr	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala
		35					40					45			

Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Pro
		50				55					60				

Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
65				70	

<210> 101

<211> 12463

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 101

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg	60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc ccgcagtttg	120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc	180
tggtctcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgacctt gacattggaa	240
gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat	300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg	360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgct atgagcgacc	420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc	480
aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc gacaagtctc tatcaccaag	540
ccaataaggg agttagagtc gcctactgga taggctttga caccaccctc tttatgttta	600
agaacttggc tggagcatat ccatactact ctaccaactg ggccgacgaa accgtgttaa	660
cggtctgtaa cataggccta tgcagctctg acgttatgga gcggtcacgt agagggatgt	720
ccattcttag aaagaagtat ttgaaaccat ccaacaatgt tctattctct gttggctcga	780

ccatctacca cgagaagagg gacttactga ggagctggca cctgccgtct gtatttctact	840
tacgtggcaa gcaaaattac acatgtcggg gtgagactat agttagtgtg gacgggtacg	900
tcgttaaaag aatagctatc agtccaggcc tgtatgggaa gccttcaggc tatgctgcta	960
cgatgcaccg cgagggattc ttgtgctgca aagtgcaga cacattgaac ggggagaggg	1020
tctcttttcc cgtgtgcacg tatgtgccag ctacattgtg tgaccaaag actggcatac	1080
tggcaacaga tgtcagtgcg gacgacgcgc aaaaactgct gggtgggctc aaccagcgta	1140
tagtcgtcaa cggtcgcacc cagagaaaca ccaataccat gaaaaattac cttttgccc	1200
tagtggccca ggcatttgct aggtgggcaa aggaatataa ggaagatcaa gaagatgaaa	1260
ggccactagg actacgagat agacagttag tcatgggggtg ttgttgggct tttagaaggc	1320
acaagataac atctatttat aagcgcccgg ataccctaac catcatcaaa gtgaacagcg	1380
atttccactc attcgtgctg cccaggatag gcagtaacac attggagatc gggctgagaa	1440
caagaatcag gaaaaatgta gaggagcaca aggagccgct acctctcatt accgccgagg	1500
acgtacaaga agctaagtgc gcagccgatg aggctaagga ggtgctgtaa gccgaggagt	1560
tgccgcgacg tctaccacct ttggcagctg atgttgagga gccactctg gaagccgatg	1620
tagacttgat gttacaagag gctggggccg gctcagtgga gacacctcgt ggcttgataa	1680
aggttaccag ctacgatggc gaggacaaga tcggctctta cgctgtgctt tctccgagg	1740
ctgtactcaa gagtgaaaaa ttatcttgca tccacctctc cgctgaacaa gtcatagtga	1800
taacacactc tggccgaaaa gggcgttatg ccgtggaacc ataccatggt aaagtagtgg	1860
tgccagaggg acatgcaata cccgtccagg actttcaagc tctgagtga agtgccacca	1920
ttgtgtacaa cgaacgtgag ttcgtaaaca ggtacctgca ccatattgcc acacatggag	1980
gagcgtgaa cactgatgaa gaatattaca aaactgtcaa gccagcgag cagcagggcg	2040
aatacttgta cgacatcgac aggaacaggt gcgtcaagaa agaactagtc actgggctag	2100
ggctcacagg cgagctgggt gatcctccct tccatgaatt cgcctacgag agtctgagaa	2160
cacgaccagc cgctccttac caagtacaa ccataggggt gtatggcgtg ccaggatcag	2220
gcaagtctgg catcattaaa agcgcagtca ccaaaaaaga tctagtgggt agcgccaaga	2280
aagaaaactg tgcagaaatt ataaggacg tcaagaaaat gaaagggtg gacgtcaatg	2340
ccagaactgt ggactcagt ctcttgaatg gatgcaaaca cccgtagag accctgtata	2400
ttgacgaagc ttttgcttgt catgcaggta ctctcagagc gctcatagcc attataagac	2460
ctaaaaaggc agtgctctgc ggggatccca aacagtgcgg tttttttaac atgatgtgcc	2520
tgaaagtgca ttttaaccac gagatttgca cacaagtctt ccacaaaagc atctctcgcc	2580
gttgactact atctgtgact tcggctgtct caacctgtt ttacgacaaa aaaatgagaa	2640
cgacgaatcc gaaagagact aagattgtga ttgacactac cggcagtacc aaacctaagc	2700
aggacgatct cattctcact tgtttcagag ggtgggtgaa gcagtgtcaa atagattaca	2760

aaggcaacga aataatgacg gcagctgcct ctcaagggct gacccgtaaa ggtgtgtatg	2820
ccgttcggta caaggtgaat gaaaatcctc tgtacgcacc cacctcagaa catgtgaacg	2880
tcctactgac ccgcacggag gaccgcatcg tgtggaaaac actagccggc gacccatgga	2940
taaaaaact gactgccaaag taccctggga atttctactgc cagcatagag gagtggcaag	3000
cagagcatga tgccatcatg aggacatct tggagagacc ggaccctacc gacgtcttcc	3060
agaataaggc aaacgtgtgt tgggccaagg ctttagtgcc ggtgctgaag accgctggca	3120
tagacatgac cactgaacaa tggaacactg tggattatct tgaaacggac aaagctcact	3180
cagcagagat agtattgaac caactatgcg tgagggtctt tggactcgat ctggactccg	3240
gtctatcttc tgcacccact gttccgttat ccattaggaa taatcactgg gataactccc	3300
cgctgcctaa catgtacggg ctgaataaag aagtggctcg tcagctctct cgcagggtacc	3360
cacaactgcc tcgggcagtt gccactggaa gagtctatga catgaacact ggtacactgc	3420
gcaattatga tccgcgcata aacctagtac ctgtaaacag aagactgcct catgctttag	3480
tcctccacca taatgaacac ccacagagtg acttttcttc attcgtcagc aaattgaagg	3540
gcagaactgt cctggtggtc ggggaaaagt tgtccgtccc aggcaaaatg gttgactggt	3600
tgtcagaccg gcctgaggct accttcagag ctccggtgga tttaggcatc ccagggtgatg	3660
tgcccaaata tgacataata tttgttaatg tgaggacccc atataaatac catcactatc	3720
agcagtgtga agaccatgcc attaagctta gcatgttgac caagaaagct tgtctgcac	3780
tgaatcccg cggaacctgt gtcagcatag gttatgggta cgctgacagg gccagcgaaa	3840
gcatcattgg tgctatagcg cggcagttca agttttcccg ggtatgcaaa ccgaaatcct	3900
cacttgaaga gacggaagtt ctgtttgtat tcattgggta cgatcgcaag gcccgtagc	3960
acaatcctta caagctttca tcaacctga ccaacattta tacaggttcc agactccacg	4020
aagccggatg tgcacctca tatcatgtgg tgcgagggga tattgccacg gccaccgaag	4080
gagtgttat aaatgctgct aacagcaaag gacaacctgg cggaggggtg tgcggagcgc	4140
tgtataagaa attcccgaa agcttcgatt tacagccgat cgaagtagga aaagcgcgac	4200
tggtcaaagg tgcagctaaa catatcatc atgccgtagg accaaacttc aacaaagtct	4260
cggaggttga aggtgacaaa cagttggcag aggcctatga gtccatcgct aagattgtca	4320
acgataacaa ttacaagtca gtagcgattc cactgttgtc caccggcatc ttttccggga	4380
acaaagatcg actaacccaa tcattgaacc atttctgac agcttttagac accactgatg	4440
cagatgtagc catatactgc agggacaaga aatgggaaat gactctcaag gaagcagtgg	4500
ctaggagaga agcagtggag gagatatgca tatccgacga ctcttcagtg acagaacctg	4560
atgcagagct ggtgaggggt catccgaaga gttctttggc tggaaggaag ggctacagca	4620
caagcgatgg caaaactttc tcatatttgg aagggaacca gtttcaccag gcggccaagg	4680

atatagcaga aattaatgcc atgtggcccg ttgcaacgga ggccaatgag caggtatgca	4740
tgtatatacct cggagaaagc atgagcagta ttaggtcgaa atgccccgtc gaagagtcgg	4800
aagcctccac accacctagc acgtgcctt gcttgtgcat ccatgccatg actccagaaa	4860
gagtacagcg cctaaaagcc tcacgtccag aacaaattac tgtgtgtcga tcctttccat	4920
tgccgaagta tagaatcact ggtgtgcaga agatccaatg ctcccagcct atattgttct	4980
caccgaaagt gcctgcgtat attcatccaa ggaagtatct cgtggaaaca ccaccggtag	5040
acgagactcc ggagccatcg gcagagaacc aatccacaga ggggacacct gaacaaccac	5100
cacttataac cgaggatgag accaggacta gaacgcctga gccgatcatc atcgaagagg	5160
aagaagagga tagcataagt ttgtgtcag atggccccgac ccaccagggtg ctgcaagtcg	5220
aggcagacat tcacggggccg ccctctgtat cttagctcatc ctggtccatt cctcatgcat	5280
ccgactttga tgtggacagt ttatccatac ttgacaccct ggaggaggct agcgtgacca	5340
gcggggcaac gtcagccgag actaactctt acttcgcaaa gagtatggag tttctggcgc	5400
gaccggtgcc tgcgcctcga acagtattca ggaaccctcc acatcccgtc ccgcgcacaa	5460
gaacaccgtc acttgacccc agcagggcct gctcgagaac cagcctagtt tccacccgc	5520
caggcgtgaa tagggtgatc actagagagg agctcgaggc gcttaccctg tcacgcactc	5580
ctagcaggtc ggtctcgaga accagcctgg tctccaaccc gccaggcgta aatagggtga	5640
ttacaagaga ggagtttgag gcgttcgtag cacaacaaca atgacggttt gatgcgggtg	5700
catacatctt ttcctccgac accggtcaag ggcatTTTaca acaaaaatca gtaaggcaaa	5760
cggtgctatc cgaagtgggtg ttggagagga ccgaattgga gatttcgtat gccccgcgcc	5820
tcgaccaaga aaaagaagaa ttactacgca agaattaca gttaaattccc acacctgcta	5880
acagaagcag ataccagtcc aggaagggtgg agaacatgaa agccataaca gctagacgta	5940
ttctgcaagg cctagggcat tatttgaagg cagaaggaaa agtggagtgc taccgaacct	6000
tgcatectgt tcctttgtat tcactctagtg tgaaccgtgc cttttcaagc cccaaggctc	6060
cagtggaagc ctgtaacgcc atgttgaaag agaactttcc gactgtggct tcttactgta	6120
ttattccaga gtacgatgcc tatttggaca tggttgacgg agcttcatgc tgcttagaca	6180
ctgccagttt ttgccctgca aagctgcgca gctttccaaa gaaacactcc tatttggaac	6240
ccacaatacg atcggcagtg ccttcagcga tccagaacac gctccagaac gtctggcag	6300
ctgccacaaa aagaaattgc aatgtcacgc aaatgagaga attgcccgtg ttggattcgg	6360
cggcctttta tgtggaatgc ttcaagaaat atgcgtgtaa taatgaatat tgggaaacgt	6420
ttaaagaaaa ccccatcagg cttactgaag aaaacgtggg aaattacatt accaaattaa	6480
aaggaccaaa agctgtgtgt ctttttgca agacacataa tttgaatatg ttgcaggaca	6540
taccaatgga caggtttgta atggacttaa agagagacgt gaaagtgact ccaggaacaa	6600
aacatactga agaacggccc aaggtacagg tgatccaggc tgccgatccg ctagcaacag	6660

cgtatctgtg cggaatccac cgagagctgg ttaggagatt aaatgcgggc ctgcttccga	6720
acattcatac actgtttgat atgtcggctg aagactttga cgctattata gccgagcact	6780
tccagcctgg ggattgtgtt ctggaaactg acatcgcgtc gtttgataaa agtgaggacg	6840
acgccatggc tctgaccgcg ttaatgattc tgggaagactt aggtgtggac gcagagctgt	6900
tgacgctgat tgaggcggct ttccggcgaat tttcatcaat acatttgccc actaaaacta	6960
aatttaaatt cggagccatg atgaaatctg gaatgttcct cactactgtt gtgaacacag	7020
tcattaacat tgtaatcgca agcagagtgt tgagagaacg gctaaccgga tcacatgtg	7080
cagcattcat tggagatgac aatatcgtga aaggagtcaa atcggacaaa ttaatggcag	7140
acaggtgcgc cacctggttg aatatggaag tcaagattat agatgctgtg gtgggcgaga	7200
aagcgcctta tttctgtgga gggtttattt tgtgtgactc cgtgaccggc acagcgtgcc	7260
gtgtggcaga cccctaataa aggtgttcta agcttgcaa acctctggca gcagacgatg	7320
aacatgatga tgacaggaga agggcattgc atgaagagtc aacacgctgg aaccgagtgg	7380
gtattctttc agagctgtgc aaggcagtag aatcaaggta tgaaaccgta ggaacttcca	7440
tcatagttat ggccatgact actctagcta gcagtgttaa atcattcagc tacctgagag	7500
gggcccctat aactctctac ggctaacctg aatggactac gacatagtct agtcgacgcc	7560
accatggaac tgctgatcct gaaggccaac gccatcacca ccatcctgac cgccgtgacc	7620
ttctgcttcg ccagcggcca gaacatcacc gaggaattct accagagcac ctgcagcgcc	7680
gtgagcaagg gctacctgag cgccctgcgg accggctggt acaccagcgt gatcaccatc	7740
gagctgtcca acatcaaaga aaacaagtgc aacggcaccc acgccaaggt gaaactgatc	7800
aagcaggaac tggacaagta caagaacgcc gtgaccgagc tgcagctgct gatgcagagc	7860
acccccgcca ccaacaaccc ggccagaaga gagctgcccc ggttcatgaa ctacaccctg	7920
aacaacgcca agaaaaccaa cgtgaccctg agcaagaagc ggaagcggcg gttcctgggc	7980
ttcctgctgg gcgtgggcag cgccatcgcc agcgggggtg ccgtgtccaa ggtgctgcac	8040
ctggaaggcg aggtgaacaa gatcaagtcc gccctgctgt ccaccaacaa ggccgtggtg	8100
tccttgagca acggcgtgag cgtgctgacc agcaaggtgc tggatctgaa gaactacatc	8160
gacaagcagc tgctgcccac cgtgaacaag cagagctgca gcatcagcaa catcgagacc	8220
gtgatcgagt tccagcagaa gaacaaccgg ctgctggaaa tcacccggga gttcagcgtg	8280
aacgccggcg tgaccacccc cgtgagcacc tacatgctga ccaacagcga gctgctgtcc	8340
ctgatcaatg acatgcccac caccaacgac cagaaaaagc tgatgagcaa caacgtgcag	8400
atcgtgcggc agcagagcta ctccatcatg agcatcatca aagaagaggt gctggcctac	8460
gtggtgcagc tgcccctgta cggcgtgatc gacaccccct gctggaagct gcacaccagc	8520
cccctgtgca ccaccaacac caaagagggc agcaacatct gcctgaccgc gaccgaccgg	8580

ggctggtact gcgacaacgc cggcagcgtg agctttcttcc cccaagccga gacctgcaag	8640
gtgcagagca accgggtggt ctgcgacacc atgaacagcc tgacctgcc ctccgaggtg	8700
aacctgtgca acgtggacat cttcaacccc aagtacgact gcaagatcat gacctccaag	8760
accgacgtga gcagctccgt gatcacctcc ctgggcgcca tcgtgagctg ctacggcaag	8820
accaagtga cgcgcagcaa caagaaccgg ggcacatca agaccttcag caacggctgc	8880
gactacgtga gcaacaaggc cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact gtactacgtg	8940
aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa cttctacgac	9000
cccctggtgt tccccagcga cgagttcgac gccagcatca gccagggtcaa cgagaagatc	9060
aaccagagcc tggccttcat ccggaagagc gacgagctgc tgcacaatgt gaatgccggc	9120
aagagcacca ccaatatcat gatcaccaca atcatcatcg tgatcattgt gatcctgctg	9180
tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcacccc tgtgacctg	9240
tccaaggacc agctgtccgg catcaacaat atcgcttctt ccaactgaag tctagacggc	9300
gcgcccaccc agcggccgca tacagcagca attggcaagc tgcttacata gaactcgcgg	9360
cgattggcat gccgccttaa aatttttatt ttatttttct tttcttttcc gaatcggatt	9420
ttgtttttaa tatttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggtcggca	9480
tggcatctcc acctcctcgc ggtccgacct gggcatccga aggaggacgc acgtccactc	9540
ggatggctaa gggagagcca cgtttaaac agctccaatt cgccctatag tgagtcgtat	9600
tacgcgcgct cactggccgt cgttttataa cgctcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc	9660
caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc	9720
cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt	9780
agcggcgcgt taagcgcggc ggggtgtgtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc	9840
agcgccctag cgcccgctcc ttctgcttcc ttccttccct ttctcgccac gttcgccggc	9900
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg	9960
cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggg gatggttcac gtatgtggcc atcgccctga	10020
tagacgggtt ttgcctctt gacgttgagg tccacgttct ttaatagtgg actcttgctc	10080
caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg	10140
ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt	10200
aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc	10260
ctatttgctt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct	10320
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg	10380
cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg	10440
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc	10500
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca atgatgagca	10560

cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac	10620
tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa	10680
agcatccttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg	10740
ataaactgac ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt	10800
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	10860
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc	10920
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga	10980
tggaaggcga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta	11040
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc	11100
cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg	11160
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt	11220
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa	11280
ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt	11340
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt	11400
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt	11460
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga	11520
taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag	11580
caccgcctac atacctcgtc ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata	11640
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg	11700
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga	11760
gatactaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca	11820
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa	11880
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt	11940
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac	12000
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt	12060
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga	12120
ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc	12180
tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaaag	12240
cgggcagtga ggcgaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt	12300
tacactttat gctccccgct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	12360
caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac	12420
aaaagctggg taccggggcc acgcgtaata cgactcacta tag	12463

<210> 102

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 102

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415
 Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430
 Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445
 Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460
 Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Ile Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 103

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 103

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Leu Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Gly Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Lys Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Asn Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300
 Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335
 Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350
 Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365
 Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
 370 375 380
 Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

150

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
 450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
 565 570

<210> 104

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 104

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Leu Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Ile Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
 100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
 115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Asn Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

152

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
 450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
 565 570

<210> 105

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 105

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Asn
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

155

Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

.

<210> 106

<211> 574

<212> Белок

<213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 106

Met Glu Leu Leu Ile His Arg Ser Ser Ala Ile Phe Leu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Val Asn Ala Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Arg Gly Tyr Phe Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Thr Lys Cys Asn Gly Thr Asp Thr Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Asn Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Ala Pro
100 105 110

Gln Tyr Met Asn Tyr Thr Ile Asn Thr Thr Lys Asn Leu Asn Val Ser
115 120 125

Ile Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asn Asn Arg Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Gln Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Met Asn Ser Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Leu Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Ser Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Ile Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Ile Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Asp Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Ser Leu Cys Asn Thr
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Ser Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Ile Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

157

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Leu Glu Gly
450 455 460

Lys Asn Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Tyr Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Arg Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Thr Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Val Leu Leu Ser Leu Ile Ala Ile
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Lys Asn Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Lys
565 570

<210> 107

<211> 574

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
консенсусная последовательность

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Leu или Pro

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> His или Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Arg или Lys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Leu, Ser или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Ser или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Phe или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Leu или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Thr или Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Ala или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Ile, Val или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Asn или Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Ala или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Leu или Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (21)..(21)
<223> Tyr или Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Leu или Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Thr или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Ser или Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (42)..(42)
<223> Arg или Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (45)..(45)
<223> Phe или Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (67)..(67)
<223> Thr или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (74)..(74)
<223> Thr или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (80)..(80)
<223> Lys или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (99)..(99)
<223> Asn или Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> Pro или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> Ala или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (111)..(111)
<223> Ala или Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (113)..(113)
<223> Gln или Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (114)..(114)
<223> Tyr или Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (119)..(119)
<223> Ile или Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (121)..(121)
<223> Thr или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (122)..(122)
<223> Thr или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (124)..(124)
<223> Asn или Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Leu или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (128)..(128)
<223> Ser или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (129)..(129)
<223> Ile или Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (152)..(152)
<223> Ile или Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (169)..(169)
<223> Asn или Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (200)..(200)
<223> Asn или Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (201)..(201)
<223> Asn или Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (202)..(202)
<223> Gln или Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (209)..(209)
<223> Gln или Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (213)..(213)
<223> Arg или Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (218)..(218)
<223> Gly, Glu или Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (226)..(226)
<223> Lys или Met

<220>
<221> MOD_RES
<222> (228)..(228)
<223> Ser или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (234)..(234)
<223> Asn или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (247)..(247)
<223> Leu или Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (276)..(276)
<223> Ser или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (305)..(305)
<223> Ile или Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (326)..(326)
<223> Ile или Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (356)..(356)
<223> Asp или Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (380)..(380)
<223> Ser или Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (384)..(384)
<223> Thr или Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (389)..(389)
<223> Ser или Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (402)..(402)
<223> Ile или Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (462)..(462)
<223> Leu или Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (466)..(466)
 <223> Asn или Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (477)..(477)
 <223> Tyr или Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (508)..(508)
 <223> Arg или Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (515)..(515)
 <223> Asn или His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (518)..(518)
 <223> Thr или Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (523)..(523)
 <223> Thr или Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (537)..(537)
 <223> Val или Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (544)..(544)
 <223> Ile или Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (553)..(553)
 <223> Lys или Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (554)..(554)
 <223> Asn или Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (574)..(574)
 <223> Lys или Asn

<400> 107
 Met Glu Leu Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

163

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Xaa Gly Tyr Xaa Ser Ala Leu
 35 40 45
 Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60
 Lys Glu Xaa Lys Cys Asn Gly Thr Asp Xaa Lys Val Lys Leu Ile Xaa
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95
 Met Gln Xaa Thr Xaa Ala Xaa Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Xaa Pro
 100 105 110
 Xaa Xaa Met Asn Tyr Thr Xaa Asn Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Asn Val Xaa
 115 120 125
 Xaa Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140
 Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Xaa Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Xaa Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175
 Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190
 Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205
 Xaa Gln Ser Cys Xaa Ile Ser Asn Ile Xaa Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220
 Gln Xaa Asn Xaa Arg Leu Leu Glu Ile Xaa Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Thr Thr Pro Xaa Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255
 Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270
 Leu Met Ser Xaa Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285
 Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro

164

290		295		300
Xaa Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro				
305		310		315 320
Leu Cys Thr Thr Asn Xaa Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg				
	325		330	335
Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe				
	340		345	350
Pro Gln Ala Xaa Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp				
	355		360	365
Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Xaa Leu Cys Asn Xaa				
	370		375	380
Asp Ile Phe Asn Xaa Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr				
	385		390	395 400
Asp Xaa Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys				
	405		410	415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile				
	420		425	430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp				
	435		440	445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Xaa Glu Gly				
	450		455	460
Lys Xaa Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Xaa Tyr Asp Pro				
	465		470	475 480
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn				
	485		490	495
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Xaa Ser Asp Glu Leu				
	500		505	510
Leu His Xaa Val Asn Xaa Gly Lys Ser Thr Xaa Asn Ile Met Ile Thr				
	515		520	525
Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Xaa Leu Leu Ser Leu Ile Ala Xaa				
	530		535	540
Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Xaa Xaa Thr Pro Val Thr Leu Ser				
	545		550	555 560

165

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Xaa
 565 570

<210> 108
 <211> 51
 <212> Белок
 <213> Респираторно-синцитиальный вирус человека

<400> 108
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro Arg Phe Met
 1 5 10 15

Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr Leu Ser Lys
 20 25 30

Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Ser
 50

<210> 109
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический
 полипептид

<400> 109
 Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Gln Gln Asn Gln Gln Arg
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser
 20 25 30

<210> 110
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетическая
 6xHis-метка

<400> 110
 His His His His His His
 1 5

<210> 111
 <211> 100
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(100)

<223> Эта последовательность может охватывать 3-100 остатков Lys

<400> 111

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
1				5					10						15		

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
			20					25							30		

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
			35					40					45				

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
			50					55					60				

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
65						70					75						80

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
				85						90						95	

Lys	Lys	Lys	Lys														
																	100

<210> 112

<211> 50

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 112

Ile	Met	Ile	Thr	Thr	Ile	Ile	Ile	Val	Ile	Ile	Val	Ile	Leu	Leu	Ser		
1					5				10					15			

Leu	Ile	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Cys	Lys	Ala	Arg	Ser	Thr	Pro		
			20					25						30			

Val	Thr	Leu	Ser	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Gly	Ile	Asn	Asn	Ile	Ala	Phe		
			35					40					45				

Ser	Asn																
																	50