

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037903**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.03

(51) Int. Cl. **A61K 31/14** (2006.01)

(21) Номер заявки
202000368

(22) Дата подачи заявки
2020.07.13

(54) **ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-CoV-2 (ВАРИАНТЫ)**

(31) **2020114424**

(32) **2020.04.23**

(33) **RU**

(43) **2021.06.02**

(86) **PCT/RU2020/000344**

(87) **WO 2021/002776 2021.01.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

**Шахмировна, Тухватулин Амир
Ильдарович, Тухватулина Наталья
Михайловна, Щербинин Дмитрий
Николаевич, Есмагамбетов Ильяс
Булатович, Токарская Елизавета
Александровна, Ботиков Андрей
Геннадьевич, Семихин Александр
Сергеевич, Борисевич Сергей
Владимирович, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович (RU)**

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

(56) **KR-A-20200032050
US-A1-2008267992**

LIANG M.F. et al., SARS patients-derived human recombinant antibodies to S and M proteins efficiently neutralize SARS-coronavirus infectivity, Biomed Environ Sci., 2005, 18(6), 363-374, abstract NCBI Reference Sequence: YP_009724390.1, 30.03.2020 [online] [retrived on 10.09.2020]. Retrived from <NCBI Database>

LANYING DU et al., A 219-mer CHO-Expressing Receptor-Binding Domain of SARS-CoV S Protein Induces Potent Immune Responses and Protective Immunity, Viral Immunol., 2010, vol. 23, N. 2, p. 211-219, abstack

(72) Изобретатель:
**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Должикова Инна Вадимовна,
Попова Ольга, Щедляков Дмитрий
Викторович, Гроусова Дарья
Михайловна, Джаруллаева Алина**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии, в частности к иммунобиологическому средству для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2. Также раскрыт способ индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих одного или более иммунобиологических средств для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2. Изобретение позволяет эффективно индуцировать иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2.

B1**037903****037903****B1**

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложенное средство может применяться для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Уровень техники

SARS-CoV-2 - новый штамм коронавируса, выделенный в конце 2019 года в г. Ухань (Китай), который за несколько месяцев распространился во всему миру. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила эпидемию, связанную с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения международного значения, а в марте 2020 года охарактеризовала распространение болезни как пандемию. В начале апреля 2020 г количество заболевших превысило 1 млн человек, а количество погибших - 60 тыс. человек.

Заболевание, которое вызывает SARS-CoV-2, получило собственное название COVID-19. Это потенциально тяжелая острая респираторная инфекция, которая может протекать как в легкой, так и в тяжелой форме и сопровождаться такими осложнениями, как пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии и др.

SARS-CoV-2 распространяется путем передачи от человека человеку воздушно-капельным путем или при прямом контакте. Репродуктивный индекс SARS-CoV-2 (Basic reproduction number, R₀), т.е. количество людей, которые заражаются от одного инфицированного человека, по разным источникам составляет от 2,68 (Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*. 2020) до 6,6 (Sanche S, Lin YT, Xu C, Romero-Severson E, Hengartner N, Ke R. The Novel Coronavirus, 2019-nCoV, is Highly Contagious and More Infectious Than Initially Estimated. *medRxiv*. 2020), а средний инкубационный период составляет 5,2 дня (Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020).

Филогенетические исследования штаммов, выделенных от больных COVID-19, показали, что наиболее близкие к SARS-CoV-2 вирусы обнаруживаются у летучих мышей (Zhou P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579: 270-273). Также, предполагается, что другие виды млекопитающих могут быть "промежуточными" хозяевами, в которых SARS-CoV-2 смог приобрести некоторые или все мутации, необходимые для эффективной передачи человеку (Zhang YZ, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*. 2020 Mar 26.)

Высокий процент смертности, быстрое географическое распространение SARS-CoV-2 и нечетко определенная этиология заболевания создали острую необходимость в создании эффективных средств профилактики и лечения заболеваний, вызываемых данным вирусом.

За прошедшие годы было предпринято немало усилий по созданию различных вакцин против коронавирусных инфекций. Разработанные кандидатные вакцины можно классифицировать на шесть типов: 1) вакцины на основе вирусных векторов; 2) ДНК-вакцины; 3) субъединичные вакцины; 4) вакцины на основе наночастиц; 5) вакцины на основе инактивированного цельного вируса; 6) живые аттенуированные вакцины. Данные вакцины были основаны на различных вирусных белках, таких как белок нуклеокапсида N, белок оболочки E, белок NSP16, S белок коронавируса (Ch. Yong et al. Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Front Microbiol*. 2019 Aug 2;10:1781). Часть из этих препаратов находится на стадии клинических исследований (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Однако, данные препараты не эффективны против нового вируса SARS-CoV-2, это объясняется главным образом низкой гомологией данного коронавируса с возбудителями заболеваний человека SARS-CoV и MERS-CoV. Так, например, степень гомологии между S белком SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет всего 76% (Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*. 2020;63(3):457-60). Таким образом, на данный момент не существует ни одной зарегистрированной вакцины против заболеваний вызываемых SARS-COV-2.

Известно решение по патенту US 7452542 B2, в котором предлагается использование живой аттенуированной коронавирусной вакцины, в которой указанный вирус характеризуется как содержащий геном, кодирующий полипептид E_{hoN}, включающий замену на тирозин⁶³⁹⁸ MHV-A59 или его аналогичное положение, и полипептид Orf2a, содержащий замену на лейцин¹⁰⁶ MHV-A59 или его аналогичное положение, и фармацевтически приемлемый разбавитель.

Известно решение по патенту WO 2016116398 A1, в котором рассматривается вакцина против коронавируса MERS-CoV, представляющая собой N-нуклеокапсидный белок вируса MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую N-нуклеокапсидный белок MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент.

Известно решение по патенту CN 100360557 C, в котором описано использование S белка вируса SARS, который имеет мутацию в одном из положений: 778D→Y; 77D→G; 244T→I; 1182K→Q; 360F→S;

479N→R или K; 480D→G; 609A→L для производства вакцины против тяжелого острого респираторного синдрома. Дата приоритета заявки 10.07.2003.

Известно решение по заявке на изобретение US 20080267992 A1, где описана вакцина против тяжелого острого респираторного синдрома на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, содержащего последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV или последовательность, которая включает домен S1 антигена S вируса SARS-CoV или домен S2 антигена S вируса SARS-CoV, или оба домена. Кроме того, данный рекомбинантный аденовирус в составе экспрессионной кассеты содержит промотор цитомегаловируса человека (CMV-промотор) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (polyA BGH).

Данный патент как наиболее близкий по техническому решению был выбран авторами заявляемого изобретения за прототип. Существенным недостатком данного решения является использование антигенов вируса другого вида семейства коронавирусов.

Таким образом, в уровне техники существует острая потребность в разработке нового иммунобиологического средства, обеспечивающего индукцию эффективного иммунного ответа против коронавируса SARS-CoV-2.

Раскрытие изобретения

Целью изобретения является создание иммунобиологического средства для эффективной индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Технический результат заключается в создании эффективного средства для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце гена (SEQ ID NO: 2).

Также указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 3).

Также указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида вируса (SEQ ID NO: 4).

Также указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита (SEQ ID NO: 5).

Также указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 6).

Также указанный технический результат достигается тем, что создано иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 на основании последовательностей генов белка S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) в комбинации с иммунобиологическими средствами (SEQ ID NO: 2), и/или (SEQ ID NO: 3), и/или (SEQ ID NO: 4), и/или (SEQ ID NO: 5), и/или (SEQ ID NO: 6).

Также указанный технический результат достигается способом индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих одного или более средств (SEQ ID NO: 1), и/или (SEQ ID NO: 2), и/или (SEQ ID NO: 3), и/или (SEQ ID NO: 4), и/или (SEQ ID NO: 5), и/или (SEQ ID NO: 6) в эффективном количестве.

Также указанный технический результат достигается способом индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, где последовательно вводят в организм млекопитающих два различных иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или два различных иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа с интервалом более чем в 1 неделю.

Также указанный технический результат достигается способом индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, где последовательно вводят в организм млекопитающих любое из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа и любое из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа с интервалом более чем в 1 неделю, или в последовательном введении в организм млекопитающих любого из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа и любого из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с интервалом более чем в 1 неделю.

Также указанный технический результат достигается способом индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, где одновременно вводят в организм млекопитающих любые два иммунобиологических средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го или 26-го серотипа.

Сущность заявленной группы изобретений поясняется чертежами, где на фиг. 1-5 представлены результаты оценки эффективности иммунизации.

Осуществление изобретения

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным иммунологическим средством на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, RBD, S-del, S-Fc, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации испытуемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %;

Ось абсцисс - различные группы животных:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь.

На фиг. 2 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным иммунологическим средством на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, RBD, S-del, S-Fc, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 15 день после иммунизации испытуемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %;

Ось абсцисс - различные группы животных:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь.

На фиг. 3 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным иммунологическим средством на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, RBD, S-del, S-Fc, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации испытуемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %;

Ось абсцисс - различные группы животных:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);

- 2) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.

На фиг. 4 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным иммунологическим средством на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, RBD, S-del, S-Fc, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по оценке доли пролиферирующих CD8+ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S вируса SARS-CoV-2, на 15 день после иммунизации испытываемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %;

Ось абсцисс - различные группы животных:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.

На фиг. 5 представлены результаты оценки эффективности разработанного иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, RBD, S-del, S-Fc, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по оценке прироста концентрации ИФН-гамма в среде после стимуляции спленоцитов иммунизированных аденовирусными конструкциями мышей линии C57/BL6 рекомбинантным полноразмерным белком S вируса SARS-CoV-2, на 15 день после иммунизации испытываемых животных.

Ось ординат - значения прироста концентрации ИФН-гамма в среде стимулированных клеток при сравнении с интактными клетками (разы).

Ось абсцисс - исследуемые группы животных: интактные животные и животные, которым вводили по 10^8 БОЕ/мышь:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.

Первым этапом в разработке иммунобиологического средства против коронавируса SARS-CoV-2 являлся выбор вакцинного антигена. В ходе работы был проведен литературный поиск, который показал, что наиболее перспективным антигеном для создания кандидатной вакцины является S белок коронавируса. Это трансмембранный гликопротеин I типа, который отвечает за связывание, слияние и проникновение вирусных частиц в клетку. Было показано, что он является индуктором нейтрализующих антител (Liang M et al, SARS patients-derived human recombinant antibodies to S and M proteins efficiently neutralize SARS-coronavirus infectivity. Biomed Environ Sci. 2005 Dec; 18(6):363-74).

S белок состоит из сигнального пептида (аминокислоты 1-12) и 3 доменов: внеклеточного домена (аминокислоты 13-1193), трансмембранного домена (аминокислоты 1194-1215), внутриклеточного домена (аминокислоты 1216-1255). Внеклеточный домен состоит из 2 субъединиц S1 и S2, и небольшого участка между ними, функции которого до конца не ясны. Субъединица S1 отвечает за связывание вируса с рецептором ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2). Участок, который находится в среднем регионе субъединицы S1 (аминокислоты 318-510) называется рецептор-связывающим доменом (receptor-binding domain (RBD)). Субъединица S2, которая содержит предполагаемый пептид слияния (putative fusion peptide) и два гептадных повтора (heptad repeats (HR1 and HR2)), отвечает за слияние между вирусом и целевой клеточной мембраной. Инфекция инициируется связыванием RBD субъединицы S1 вируса с клеточным рецептором ACE2. После этого формируется ядро слияния между HR1 и HR2 регионами субъединицы S2, что влечет за собой сближение вирусной и клеточной мембран, которые в результате сливаются и вирус проникает в клетку. Следовательно, использование S белка или его фрагментов, в составе вакцины, может индуцировать антитела, блокирующие проникновение вируса в клетку.

Для достижения максимально эффективной индукции иммунных реакций авторы предложили раз-

личные варианты модификаций данного антигена, а также возможность его комбинации с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита для повышения уровня экспрессии целевого белка.

Было получено 6 различных вариантов нуклеотидных последовательностей (модифицированного гена S вируса SARS-CoV-2 либо рецептор-связывающего домена белка S) путем оптимизации данных последовательностей под экспрессию в клетках млекопитающих.

Далее было разработано несколько конструкций на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов для эффективной доставки модифицированных генов в клетки млекопитающих. Аденовирусные векторы были выбраны, поскольку они обладают такими преимуществами, как безопасность, широкий диапазон тканевого тропизма, хорошо охарактеризованный геном, легкость генетических манипуляций, способность включать большие вставки трансгенной ДНК, присущие им свойства адьюванта, способность индуцировать устойчивый Т-клеточный и гуморальный ответ.

Из ряда известных аденовирусов, наиболее исследованными являются аденовирусы человека 5-го серотипа, поэтому они стали основой для создания векторов для генотерапии. Были разработаны технологии получения векторов первого и второго поколений, химерных векторов (содержащих белки вирусов других серотипов) (J.N. Glasgow et al., An adenovirus vector with a chimeric fiber derived from canine adenovirus type 2 displays novel tropism, *Virology*, 2004, № 324, 103-116) и ряда других векторов. Также были созданы векторы, производные от других серотипов, например 26-го (H. Chen et al., Adenovirus-Based Vaccines: Comparison of Vectors from Three Species of Adenoviridae, *Virology*, 2010, № 84(20), 10522-10532).

Векторы на основе аденовируса человека 26-го серотипа показывают высокий уровень иммуногенности у приматов, где они способны индуцировать мощный CD8⁺ Т-клеточный ответ, качественно превосходящий Т-клеточный ответ при введении в организм векторов на основе аденовируса человека 5-го серотипа (J. Liu et al., Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys, *Virology*, 2008, № 82, 4844-4852). При этом происходит распознавание большего числа эпитопов и индукция выработки более широкого спектра факторов, а не преимущественно интерферона гамма (J. Liu et al., Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys, *Virology*, 2008, № 82, 4844-4852). Эти данные позволяют предполагать, что векторы на основе аденовируса человека 26-го серотипа обладают фундаментальными отличиями в способности индуцировать формирование иммунного ответа на целевой антиген относительно других аденовирусных векторов.

Изобретение по варианту 1 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа, или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 на основании последовательностей генов белка S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1).

Изобретение по варианту 2 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на С'-конце гена (SEQ ID NO: 2).

Изобретение по варианту 3 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 3).

Изобретение по варианту 4 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида вируса (SEQ ID NO: 4).

Изобретение по варианту 5 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита (SEQ ID NO: 5).

Изобретение по варианту 6 представляет собой рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа или рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (SEQ ID NO: 6).

Разработан способ индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, включающий во введении в организм млекопитающих одного или более средств по вариантам 1-6 в эффективном количестве. Данный способ предусматривает:

1) последовательное введение в организм млекопитающих двух различных иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или двух различных иммуно-

биологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа по вариантам 1-6 с интервалом более чем в 1 неделю;

2) последовательное введение в организм млекопитающих любого из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа и любое из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа по вариантам 1-6 с интервалом более чем в 1 неделю, или в последовательном введении в организм млекопитающих любого из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа и любого из иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа по вариантам 1-6 с интервалом более чем в 1 неделю;

3) одновременное введение в организм млекопитающих любых двух иммунобиологических средств на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го или 26-го серотипа по п.1, и/или п.2, и/или п.3, и/или п.4, и/или п.5, и/или п.6.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение различных вариантов гликопротеина S SARS-CoV-2.

На первом этапе работы авторы разработали несколько модификаций вакцинного антигена для достижения наиболее эффективного иммунного ответа.

За основу был взят S белок вируса SARS-CoV-2 с последовательностью SEQ ID NO: 1, который затем был модифицирован несколькими способами:

1) Для представления белка S на плазматической мембране была произведена делеция 18 аминокислот на C'-конце белка S (S-del) SEQ ID NO: 2 (использована для варианта 2).

2) Кроме того, была получена оптимизированная экспрессия в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (использована для варианта 3). Такая модификация усиливает иммуногенность за счет возможного связывания Fc фрагмента белка с Fc рецептором на антиген-презентирующих клетках (Li Z., Palaniyandi S., Zeng R., Tuo W., Roopenian D.C., Zhu X., Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2011, № 108, 4388-93), а также увеличивает стабильность белка и продлевает период его полу-жизни in vivo (Zhang M.Y., Wang Y., Mankowski M.K., Ptak R.G., Dimitrov D.S., Cross-reactive HIV-1-neutralizing activity of serum IgG from a rabbit immunized with gp41 fused to IgG1 Fc: Possible role of the prolonged half-life of the immunogen, Vaccine, 2009, № 27, 857-863).

3) Для исследования иммуногенности только рецептор-связывающего домена (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2 в секретируемой форме, была создана последовательность SEQ ID NO: 4 (использована для варианта 4), содержащая последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью лидерного пептида (добавлена для секреции белка).

4) Для исследования RBD белка S вируса SARS-CoV-2 в несекретируемой форме, была выбрана последовательность SEQ ID NO: 5 (использована для варианта 5), состоящая из RBD белка S вируса SARS-CoV-2, к которой была добавлена последовательность трансмембранного домена гликопротеина вируса везикулярного стоматита (RBD-G).

5) Для исследования секретируемой формы RBD белка S с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 была выбрана последовательность SEQ ID NO: 6 (использована для варианта 6). Добавление Fc-фрагмента от человеческого IgG1 усиливает иммуногенность за счет возможного связывания Fc фрагмента белка с Fc рецептором на антиген-презентирующих клетках (Z. Li et al., Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2011, № 108, 4388-4393), а также может усилить стабильность белка и продлить период полужизни in vivo (M.Y. Zhang et al., Crossreactive HIV-1-neutralizing activity of serum IgG from a rabbit immunized with gp41 fused to IgG1 Fc: Possible role of the prolonged half-life of the immunogen, Vaccine, 2008, № 27, 857-63).

Пример 2. Получение генетических конструкций, кодирующих ген белка S в различных вариантах.

На следующем этапе работы аминокислотные последовательности по примеру 1 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6) были переведены в нуклеотидные последовательности. Далее была проведена оптимизация полученных последовательностей под экспрессию в клетках млекопитающих. Все нуклеотидные последовательности были получены методом синтеза компанией ЗАО "Евроген" (Москва). В итоге были получены следующие генетические конструкции:

1) pVax-S-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность полного гена S вируса SARS-CoV-2;

2) pVax-S-del-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность гена S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце гена;

3) pVax-S-Fc-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность полного гена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1;

4) pAL2-T-RBD-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего

домена белка S с последовательностью гена лидерного пептида;

5) pAL2-T-RBD-G-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с геном G вируса везикулярного стоматита;

6) pAL2-T-RBD-Fc-CoV-2, содержащая нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью гена лидерного пептида и нуклеотидной последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1.

Далее с помощью методов генной инженерии последовательность гена белка S из конструкции pVax-S-CoV-2 была клонирована с использованием эндонуклеазы рестрикции XbaI в челночную плазмиду pShuttle-CMV (StrataGen, США) и полученная плазида была названа pShuttle-S-CoV-2. Таким образом, была создана челночная плазида pShuttle-S-CoV-2, несущая оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность аминокислотной последовательности S (SEQ ID NO: 1), полученной в примере 1.

Аналогично нуклеотидные последовательности модифицированных вариантов белка S SARS-CoV-2 были клонированы в челночную плазмиду pShuttle-CMV (StrataGen, США) и были получены следующие челночные плазмиды:

pShuttle-S-del-CoV-2 (содержит оптимизированную нуклеотидную последовательность гена S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце);

pShuttle-S-Fc-CoV-2, содержащая оптимизированную нуклеотидную последовательность полного гена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1;

pShuttle-RBD-CoV-2 (содержит оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена S SARS-CoV-2);

pShuttle-RBD-G-CoV-2 (содержит оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена S SARS-CoV-2 с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита);

pShuttle-RBD-Fc-CoV-2 (содержит оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена S SARS-CoV-2 с оптимизированной последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1).

Пример 3. Получение иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа.

На следующем этапе работы была получена рекомбинантная аденовирусная плазида pAd5-S-CoV-2, содержащая оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) (вариант 1). Данная плазида была получена методом гомологичной рекомбинации между плазмидой pAd, содержащей геномную часть аденовируса человека 5 серотипа с удаленной E1 и E3 областями, и челночной плазмидой pShuttle-S (полученной в примере 3), несущей гомологичные участки генома аденовируса и экспрессионную кассету с целевым геном (белка S). Для этого, полученная в примере 3 челночная плазида pShuttle-S была линейаризована эндонуклеазой рестрикции PmeI.

Гомологичную рекомбинацию проводили в клетках E.coli штамма BJ5183. Плазмиду pAd смешивали с плазмидой pShuttle-S, а затем полученной смесью трансформировали клетки E.coli методом электропорации согласно руководству "MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide" (Bio-Rad, США). После трансформации клетки E.coli штамма BJ5183 высевали на чашки с LB-агаром, содержащим селективный антибиотик и подращивали в течение 18 ч при температуре 37°C. Эффективность трансформации составляла 10^{10} - 10^{11} трансформированных клонов на 1 мкг плазмиды pBluescript II SK(-).

В результате гомологичной рекомбинации в плазмиде pAd появлялась кассета с целевым трансгеном (белка S), и менялся ген устойчивости к антибиотику.

Таким образом, была сконструирована рекомбинантная аденовирусная плазида pAd5-S-CoV-2, содержащая полноразмерный геном рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа (с делетированными E1 и E3 областями генома) со встроенной генетической конструкцией, полученной в примере 3. Далее плазмиду pAd5-S-CoV-2 гидролизуют эндонуклеазой рестрикции Pac I и трансфецировали ею пермиссивную культуру клеток эмбриональной почки человека линии HEK 293. Клетки линии HEK 293 содержат в своем геноме встроенную область E1 генома аденовируса человека 5-го серотипа, благодаря чему в них может происходить размножение рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов человека 5-го серотипа. На шестой день после трансфекции проводили первые слепые пассажи для более эффективного получения рекомбинантного аденовируса. После наступления цитопатического действия вируса (данные микроскопирования), клетки с культуральной средой трехкратно перемораживали для разрушения клеток и выхода вируса. В результате был получен материал, который затем был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантных аденовирусов.

Активность препарата pAd5-S-CoV-2 здесь и далее оценивали стандартным методом титрования на культуре чувствительных клеток 293 HEK в реакциях бляшкообразования.

Для подтверждения создания конструкции предлагаемой рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе аденовируса человека 5 серотипа, экспрессирующей ген S вируса SARS-CoV-2, прово-

дили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) по известной стандартной методике.

Аналогичным образом были получены еще пять рекомбинантных аденовирусов: Ad5-S-del-CoV-2, Ad5-S-Fc-CoV-2, Ad5-RBD-CoV-2, Ad5-RBD-G-CoV-2, Ad5-RBD-Fc-CoV-2.

Таким образом, в результате проведенной работы были получены варианты иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащего:

- 1) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена S SARS-CoV-2 (вариант 1);
- 2) оптимизированную нуклеотидную последовательность протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце гена (вариант 2);
- 3) оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (вариант 3);
- 4) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью лидерного пептида (вариант 4);
- 5) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита (вариант 5);
- 6) оптимизированную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (вариант 6).

Пример 4. Получение иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа

На первом этапе, в рекомбинантный вектор pAd26-ORF6-Ad5 была помещена экспрессионная каскада с геном S SARS-CoV-2. Для этого вектор pAd26-ORF6-Ad5 был линейаризован с помощью эндонуклеазы рестрикции PmeI, а плазмидная конструкция pShuttle-S, полученная в примере 3 была обработана эндонуклеазами рестрикции PmeI. Продукты гидролиза лигировали, после чего при помощи стандартных методов была получена плазида pAd26-S-CoV-2.

На следующем этапе плазмиду pAd26-S-CoV-2 гидролизировали эндонуклеазами рестрикции Pad и SwaI и трансфицировали ею пермиссивную культуру клеток линии HEK 293. На третий день после трансфекции проводили первые слепые пассажи для более эффективного получения рекомбинантного аденовируса. После наступления цитопатического действия вируса (данные микроскопирования), клетки с культуральной средой трехкратно перемораживали для разрушения клеток и выхода вируса. В результате был получен материал, который затем был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантных аденовирусов. Активность препарата pAd26-S-CoV-2 здесь и далее оценивали стандартным методом титрования на культуре клеток 293 HEK в реакции бляшкообразования.

Для подтверждения создания конструкции предлагаемой рекомбинантной псевдоаденовирусной частицы на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, экспрессирующей ген S SARS-CoV-2, проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) по известной стандартной методике.

Аналогичным образом были получены еще пять рекомбинантных аденовирусов: pAd26-S-dek-CoV-2, pAd26-S-Fc-CoV-2, pAd26-RBD-CoV-2, pAd26-RBD-G-CoV-2, pAd26-RBD-Fc-CoV-2.

Таким образом, в результате проведенной работы были получены варианты иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащего:

- 1) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена S SARS-CoV-2 (вариант 1);
- 2) оптимизированную нуклеотидную последовательность протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце гена (вариант 2);
- 3) оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (вариант 3);
- 4) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью лидерного пептида (вариант 4);
- 5) оптимизированную нуклеотидную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита (вариант 5);
- 6) оптимизированную последовательность рецептор-связывающего домена белка S с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 (вариант 6).

Пример 5. Проверка экспрессии различных вариантов гена гликопротеина S SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293 после добавления иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа.

Целью данного эксперимента была проверка способности сконструированных рекомбинантных аденовирусов Ad5-S-CoV-2, Ad5-S-del-CoV-2, Ad5-S-Fc-CoV-2, Ad5-RBD-CoV-2, Ad5-RBD-G-CoV-2, Ad5-RBD-Fc-CoV-2 экспрессировать различные варианты гена белка S в клетках млекопитающих.

Клетки HEK293 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Клетки помещали на 35 мм² культуральные чашки Петри и инкубировали в течение суток до достижения 70% конфлюэнтности. Далее к клеткам добавили

исследуемые препараты рекомбинантных аденовирусов (Ad5-S-CoV-2, Ad5-S-del-CoV-2, Ad5-S-Fc-CoV-2, Ad5-RBD-CoV-2, Ad5-RBD-G-CoV-2, Ad5-RBD-Fc-CoV-2), контрольный препарат (Ad5-null - рекомбинантный аденовирус, не содержащий вставок) из расчета 100 БОЕ/клетку и фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в качестве отрицательного контроля. Через 2 суток после трансдукции клетки собрали, лизировали в 0,5 мл однократного буфера CCLR (Promega), лизат развели карбонат-бикарбонатным буфером и внесли в лунки планшета для ИФА. Инкубировали планшет в течение ночи 4°C.

Промыли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку, а затем внесли по 100 мкл блокирующего буфера, накрыли крышкой и инкубировали 1 ч 37°C на шейкере при 400 об/мин. Далее промыли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку и внесли по 100 мкл сыворотки крови реконвалесцента. Накрыли планшет крышкой и инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 2 ч. Далее промыли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку, затем внесли 100 мкл раствора вторичных антител, конъюгированных с биотином. Накрыли планшет крышкой и инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 2 ч. Далее приготовили раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Для этого развели конъюгат объемом 60 мкл в 5,94 мл буфера для анализа. Промыли лунки планшета дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл раствора стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 1 ч. Затем лунки планшета промыли дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл ТМБ субстрата и инкубировали в темноте при комнатной температуре 10 мин, а затем добавили во все лунки по 100 мкл оставляющего раствора. Значение оптической плотности определяли измерением на планшетном спектрофотометре (Multiskan FC, Thermo) при длине волны 450 нм. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты эксперимента по проверке экспрессии различных вариантов гена гликопротеина S SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293 после добавления иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа

	Среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм
ФСБ	0,19 ($\pm 0,05$)
Ad5-null	0,23 ($\pm 0,08$)
Ad5-S-CoV-2	1,85 ($\pm 0,15$)
Ad5-S-del-CoV-2,	1,63 ($\pm 0,19$)
Ad5-S-Fc-CoV-2	1,57 ($\pm 0,30$)
Ad5-RBD-CoV-2	1,47 ($\pm 0,21$)
Ad5-RBD-G-CoV-2	1,52 ($\pm 0,19$)
Ad5-RBD-Fc-CoV-2	1,58 ($\pm 0,11$)

Как видно из полученных данных, во всех клетках, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами Ad5-S-CoV-2, Ad5-S-del-CoV-2, Ad5-S-Fc-CoV-2, Ad5-RBD-CoV-2, Ad5-RBD-G-CoV-2, Ad5-RBD-Fc-CoV-2 наблюдалась экспрессия различных вариантов целевого белка.

Пример 6. Проверка экспрессии различных вариантов гена гликопротеина S SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293 после добавления иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа.

Целью данного эксперимента была проверка способности сконструированных рекомбинантных аденовирусов pAd26-S-CoV-2, Ad26-S-del-CoV-2, Ad26-S-Fc-CoV-2, pAd26-RBD-CoV-2, pAd26-RBD-G-CoV-2, pAd26-RBD-Fc-CoV-2 экспрессировать различные варианты гена белка S в клетках млекопитающих.

Клетки HEK293 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Клетки помещали на 35 мм² культуральные чашки Петри и инкубировали в течение суток до достижения 70% конфлюэнтности. Далее к клеткам добавили исследуемые препараты рекомбинантных аденовирусов (pAd26-S-CoV-2, Ad26-S-del-CoV-2, Ad26-S-Fc-CoV-2, pAd26-RBD-CoV-2, pAd26-RBD-G-CoV-2, pAd26-RBD-Fc-CoV-2), контрольный препарат (Ad26-null - рекомбинантный аденовирус, не содержащий вставок) из расчета 100 БОЕ/клетку и фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в качестве отрицательного контроля. Через 2 суток после трансдукции клетки собрали, лизировали в 0,5 мл однократного буфера CCLR (Promega), лизат развели карбонат-бикарбонатным буфером и внесли в лунки планшета для ИФА. Инкубировали планшет в течение ночи 4°C.

Промыли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку, а затем внесли по 100 мкл блокирующего буфера, накрыли крышкой и инкубировали 1 ч 37°C на шейкере при 400 об/мин. Далее промыли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку и внесли по 100 мкл сыворотки крови реконвалесцента. Накрыли планшет крышкой и инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 2 ч. Далее промы-

ли лунки планшета однократным буфером для промывки трижды объемом 200 мкл на лунку, затем внесли 100 мкл раствора вторичных антител, конъюгированных с биотином. Накрыли планшет крышкой и инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 2 ч. Далее приготовили раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Для этого развели конъюгат объемом 60 мкл в 5,94 мл буфера для анализа. Промыли лунки планшета дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл раствора стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 1 ч. Затем лунки планшета промыли дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл ТМБ субстрата и инкубировали в темноте при комнатной температуре 10 мин, а затем добавили во все лунки по 100 мкл оставшегося раствора. Значение оптической плотности определяли измерением на планшетном спектрофотометре (Multiskan FC, Thermo) при длине волны 450 нм. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты эксперимента по проверке экспрессии различных вариантов гена гликопротеина S SARS-CoV-2 в клетках линии HEK293 после добавления иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа

	Среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм
ФСБ	0,17 ($\pm 0,08$)
Ad26-null	0,22 ($\pm 0,09$)
Ad26-S-CoV-2	1,68 ($\pm 0,21$)
Ad26-S-del-CoV-2	1,65 (0,14)
Ad26-S-Fc-CoV-2	1,71 ($\pm 0,13$)
Ad26-RBD-CoV-2	1,61 ($\pm 0,18$)
Ad26-RBD-G-CoV-2	1,45 ($\pm 0,22$)
Ad26-RBD-Fc-CoV-2	1,51 $\pm$ (0,14)

Как видно из полученных данных, во всех клетках, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами pAd26-S-CoV-2, Ad26-S-del-CoV-2, Ad26-S-Fc-CoV-2, pAd26-RBD-CoV-2, pAd26-RBD-G-CoV-2, pAd26-RBD-Fc-CoV-2 наблюдалась экспрессия различных вариантов целевого белка.

Пример 7. Способ использования разработанного иммунобиологического средства путем однократного введения в организм млекопитающих в эффективном количестве для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Разработанное иммунобиологическое средство на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, S-del, S-Fc, RBD, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 используется путем введения в организм млекопитающих любым из известных для данного вирусного вектора способов введения (подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраназально). При этом в организме млекопитающих развивается иммунный ответ к целевому белку гликопротеина SARS-CoV-2.

Одной из основных характеристик эффективности иммунизации является титр антител. В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гликопротеина SARS-CoV-2 через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных иммунобиологическим средством, включающим рекомбинантный аденовирус человека 5-го или 26-го серотипа, содержащий оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, S-del, S-Fc, RBD, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

В эксперименте использовались млекопитающие - мыши линии C57BL/6, самки 18 г. Все животные были разделены на 43 групп по 5 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad5-S-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 2) Ad5-S-del-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-RBD-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-null 10^7 БОЕ/мышь;
- 8) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 9) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 10) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 11) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 12) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;

- 13) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 14) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 15) Ad5-S-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 16) Ad5-S-del-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 17) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 18) Ad5-RBD-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 19) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 20) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 21) Ad5-null 10^9 БОЕ/мышь;
- 22) Ad26-S-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 23) Ad26-S-del-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 24) Ad26-S-Fc-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 25) Ad26-RBD-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 26) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 27) Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10^7 БОЕ/мышь;
- 28) Ad26-null 10^7 БОЕ/мышь;
- 29) Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 30) Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 31) Ad26-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 32) Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 33) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 34) Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 35) Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 36) Ad26-S-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 37) Ad26-S-del-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 38) Ad26-S-Fc-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 39) Ad26-RBD-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 40) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 41) Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10^9 БОЕ/мышь;
- 42) Ad26-null 10^9 БОЕ/мышь;
- 43) фосфатно-солевой буфер.

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу.

1) Белок (S) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществилась "забивка" планшета 5% молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.

3) Методом 2-кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.

4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.

5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C .

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.

8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C .

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 1.

Таблица 3

Титр антител к белку S в сыворотке крови мышей
(среднее геометрическое значение титра антител)

Рекомбинантный аденовирус	БОЕ/мышь		
	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
Ad5-null	0	0	0
Ad5-S-CoV-2	1:10809	1:18820	1:57052
Ad5-S-del-CoV-2	1:21619	1:28526	1:114105
Ad5-S-Fc-CoV-2	1:14263	1:18820	1:57052
Ad5-RBD-CoV-2	1:12417	1:14263	1:99334
Ad5-RBD-G-CoV-2	1:32768	1:49667	1:172951
Ad5-RBD-Fc-CoV-2	1:10809	1:12417	1:28526
Ad26-null	0	0	0
Ad26-S-CoV-2	1:18820	1:24834	1:43238
Ad26-S-del-CoV-2	1:24834	1:43238	1:57052
Ad26-S-Fc-CoV-2	1:28526	1:32768	1:86475
Ad26-RBD-CoV-2	1:12417	1:18820	1:86475
Ad26-RBD-G-CoV-2	1:24834	1:32768	1:150562
Ad26-RBD-Fc-CoV-2	1:9410	1:12417	1:24834

Результаты эксперимента показали, что разработанное иммунобиологическое средство, введенное в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к гликопротеину SARS-CoV-2 во всем диапазоне выбранных доз. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 8. Способ использования разработанного иммунобиологического средства путем последовательно введения в организм млекопитающих в эффективном количестве для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

В данном примере описан способ использования разработанного иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, S-del, S-Fc, RBD, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 путем их последовательного введения в организм млекопитающих с интервалом в 1 неделю, для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7.

Все животные были разделены на 29 групп (по 3 животных), которым внутримышечно вводили:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 4) Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 8) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 9) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 10) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 11) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 12) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 13) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 14) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 15) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 16) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 17) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 18) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 19) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 20) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 21) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 22) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 23) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 24) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 25) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 26) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 27) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 28) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 29) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 30) Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

- 31) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 32) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 33) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 34) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 35) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 36) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 37) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 38) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 39) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 40) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 41) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.
 Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей контрольных групп

		Вторая иммунизация (через неделю)	
		PBS	Ad5-null
Первая иммунизация	PBS	0	0
	Ad5-null	0	0

Таблица 5

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей опытных групп

		Вторая иммунизация (через неделю)					
		Ad5-S-CoV-2	Ad5-S-del-CoV-2	Ad5-S-Fc-CoV-2	Ad5-RBD-CoV-2	Ad5-RBD-G-CoV-2	Ad5-RBD-Fc-CoV-2
Первая иммунизация	Ad5-S-CoV-2	1:32768	1:131072	1:104032	1:131072	1:65536	1:104032
	Ad5-S-del-CoV-2	1:65536	1:131072	1:131072	1:131072	1:65536	1:104032
	Ad5-S-Fc-CoV-2	1:65536	1:104032	1:65536	1:104032	1:52016	1:131072
	Ad5-RBD-CoV-2	1:52016	1:65536	1:131072	1:65536	1:32768	1:52016
	Ad5-RBD-G-CoV-2	1:13107	1:131072	1:104032	1:131072	1:65536	1:104032
	Ad5-RBD-Fc-CoV-2	1:82570	1:131072	1:65536	1:32768	1:65536	1:65536
	Ad5-RBD-Fc-CoV-2						

Таким образом, результаты эксперимента полностью подтвердили, что последовательная иммунизация разработанными иммунобиологическими средствами в различных комбинациях, включающими различные формы белка S SARS-CoV-2 вызовет более мощную индукцию иммунного ответа, чем иммунизация по аналогичной схеме одним и тем же антигеном.

Пример 9. Определение эффективности иммунизации разработанным иммунобиологическим средством по оценке доли пролиферирующих лимфоцитов.

Пролиферативный анализ позволяет оценивать способность лимфоцитов усиленно делиться после встречи с антигеном. Для того чтобы оценить пролиферацию, авторы использовали окраску лимфоцитов флуоресцентным красителем CFSE. Данный краситель связывается с клеточными белками, и сохраняется долгое время и при этом никогда не передается соседним клеткам в популяции. Однако флуоресцентная метка передается дочерним клеткам. Концентрация метки, а, следовательно, и интенсивность флуоресценции, снижаются ровно в два раза. Поэтому делящиеся клетки легко отслеживать по уменьшению их флуоресценции.

В эксперименте использовались мыши линии C57BL/6. Все животные были разделены на 8 групп (по 3 животных), которым внутримышечно вводили:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 8) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.

Дозы рекомбинантных аденовирусов были выбраны на основании данных, полученных при определении титра антител.

Через две недели животных усыпляли. Из селезенки выделяли лимфоциты методом центрифугирования в градиенте фиколла-урографина. Затем выделенные клетки окрашивали CFSE по методике (B.J. Quah et al., Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Nature Protocols, 2007, № 2(9), 2049-2056) и культивировали в присутствии антигена. Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены на фиг. 1-4. Таким образом, можно заключить, что полученные аденовирусные конструкции индуцируют формирование антиген-специфического иммунного ответа (как CD4+, так и CD8+).

Как видно из результатов эксперимента (фиг. 1-4), разработанные иммунобиологические средства по пп. 1-5 в данной дозе эффективно стимулируют пролиферацию лимфоцитов.

Пример 10. Способ использования разработанных иммунобиологических средств на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов путем их последовательного введения в организм млекопитающих для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7. Комбинации иммунобиологических средств были выбраны исходя из примеров 7 и 8.

Все животные были разделены на 31 группу (по 3 животных), которым внутримышечно вводили:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 3) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 4) Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 6) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 8) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 9) Ad26-null 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь;
- 10) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 11) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 12) Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 13) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 14) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 15) Ad26-S-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 16) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 17) Ad26-S-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 18) Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 19) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 20) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 21) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 22) Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 23) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 24) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 25) Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 26) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 27) Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 28) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 29) Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 30) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
- 31) Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей контрольных групп

		Вторая иммунизация (через неделю)		
		PBS	Ad5-null	Ad26-null
Первая иммунизация	PBS	0	0	0
	Ad5-null	0	0	0
	Ad26-null	0	0	0

Таблица 7

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей опытных групп

Группа животных	Среднее геометрическое значение титра антител
Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-G 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:208064
Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:1321123
Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:832255
Ad26-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:1321123
Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:165140
Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:104032
Ad5-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:104032
Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:52016
Ad26-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:131072
Ad5-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:104032
Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:165140
Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:208064
Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:660561
Ad26-RBD-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:416128
Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:208064
Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:65536
Ad5-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:131072
Ad26-RBD-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:165140
Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:208064
Ad26-S-G-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:208064
Ad5-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:165140
Ad26-S-CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5- S-del -CoV-2 10 ⁸ БОЕ/мышь	1:165140

Таким образом, результаты эксперимента полностью подтвердили, что последовательная иммунизация разработанными иммунобиологическими средствами, включающими различные аденовирусные векторы (на основе аденовирусов человека 5-го и 26-го серотипов) вызовет более мощную индукцию иммунного ответа, чем иммунизация по аналогичной схеме одним и тем же вектором.

Пример 11. Определение эффективности иммунизации разработанным иммунобиологическим средством по оценке индукции ИФН-гамма.

В данном эксперименте проводили оценку эффективности иммунизации разработанным иммуно-

биологическим средством на основе рекомбинантного аденовируса, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, S-del, S-Fc, RBD, RBD-G, RBD-Fc) вируса SARS-COV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 по определению прироста концентрации ИФН-гамма в среде после стимуляции спленоцитов иммунизированных аденовирусными конструкциями мышей линии C57/BL6 рекомбинантным полноразмерным белком S вируса SARS-CoV-2.

Для определения уровня ИФН-гамма был использован набор Mouse IFN gamma Platinum ELISA (Affymetrix eBioscience, USA).

Порядок проведения ИФА. Промыли лунки планшета однократным буфером для промывки дважды объемом 200 мкл на лунку, а затем внесли по 100 мкл стандартов и 100 мкл раствора для разведения образцов в качестве отрицательного контроля. В лунки образцов внесли по 50 мкл раствора для разведения образцов, а затем по 50 мкл самих образцов (среда от стимулированных спленоцитов). Приготовили раствор антител, конъюгированных с биотином. Для этого развели конъюгат объемом 60 мкл в 5,94 мл буфера для анализа. Затем во все лунки внесли по 50 мкл раствора антител, конъюгированных с биотином, накрыли планшет крышкой и инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 2 ч. Далее приготовили раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Для этого развели конъюгат объемом 60 мкл в 5,94 мл буфера для анализа. Промыли лунки планшета дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл раствора стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин в течение 1 ч. Затем лунки планшета промыли дважды однократным буфером для промывки объемом 200 мкл на лунку и во все лунки планшета внесли по 100 мкл ТМБ субстрата и инкубировали в темноте при комнатной температуре 10 мин, а затем добавили во все лунки по 100 мкл останавливающего раствора. Значение оптической плотности определяли измерением на планшетном спектрофотометре (Multiskan FC, Thermo) при длине волны 450 нм.

Результаты измерения продукции ИФН-гамма на 15-й день после иммунизации испытуемых животных аденовирусными конструкциями представлены графически на фиг. 5 в виде прироста концентрации ИФН-гамма (разы) при сравнении клеток, стимулированных рекомбинантным полноразмерным белком S вируса SARS-CoV-2, с интактными клетками.

По результатам исследования было показано, что введение полученных конструкций животным приводит высокому уровню индукции экспрессии ИФН-гамма спленоцитами при стимуляции рекомбинантным белком S вируса SARS-CoV-2, что свидетельствует о формировании специфического Т-клеточного иммунитета.

Пример 12. Способ использования разработанных иммунобиологических средств на основе рекомбинантных аденовирусов человека 5-го серотипа, содержащих оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белка S и RBD-G) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 путем их одновременного введения в организм млекопитающих, для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7. Комбинация иммунобиологических средств была выбрана исходя из примеров 8 и 11.

Все животные были разделены на 17 групп (по 5 животных), которым внутримышечно вводили:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-null 10^5 вирусных частиц/мышь;
- 3) Ad5-null 10^6 вирусных частиц/мышь;
- 4) Ad5-null 10^7 вирусных частиц/мышь;
- 5) Ad5-null 10^8 вирусных частиц/мышь;
- 6) Ad5-null 10^9 вирусных частиц/мышь;
- 7) Ad5-null 10^{10} вирусных частиц/мышь;
- 8) Ad5-null 5×10^{10} вирусных частиц/мышь;
- 9) Ad5-null 10^{11} вирусных частиц/мышь;
- 10) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^5 вирусных частиц/мышь;
- 11) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^6 вирусных частиц/мышь;
- 12) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^7 вирусных частиц/мышь;
- 13) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 вирусных частиц/мышь;
- 14) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^9 вирусных частиц/мышь;
- 15) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^{10} вирусных частиц/мышь;
- 16) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 5×10^{10} вирусных частиц/мышь;
- 17) Ad5-S-CoV-2 + Ad5-RBD-G-CoV-2 10^{11} вирусных частиц/мышь.

Результаты представлены в табл. 8 и 9.

Таблица 8

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей контрольных групп

Группа животных	Среднее геометрическое значение титра антител к белку S SARS-CoV-2
фосфатный буфер	0
Ad5-null 10 ⁵ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ⁶ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ⁷ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ⁸ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ⁹ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ¹⁰ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 5*10 ¹⁰ вирусных частиц/мышь	0
Ad5-null 10 ¹¹ вирусных частиц/мышь	0

Таблица 9

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей опытных групп

Группа животных, вирусных частиц/мышь	Среднее геометрическое значение титра антител к белку S SARS-CoV-2
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁵	0
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁶	1:14263
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁷	1:99334
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁸	1:131072
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ⁹	1:172951
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ¹⁰	1:301124
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 5*10 ¹⁰	1:345901
Ad5-S-CoV-2+ Ad5-RBD-G-CoV-2 10 ¹¹	1:524288

Таким образом, результаты эксперимента полностью подтвердили, что одновременная иммунизация разработанными иммунобиологическими средствами индуцирует гуморальный иммунный ответ к гликопротеину SARS-CoV-2 в диапазоне доз от 10⁶ вирусных частиц/мышь до 10¹¹ вирусных частиц/мышь. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 13 Способ использования разработанного иммунобиологического средства путем последовательно введения в организм млекопитающих через различные интервалы времени в эффективном количестве для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

В данном примере описан способ использования разработанного иммунобиологического средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность протективного антигена (белков S, S-del, RBD, RBD-G, RBD-Fc) SARS-CoV-2 с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 путем их последовательного введения в организм млекопитающих с интервалом в 1 неделю или с интервалом в 3 недели для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7.

Все животные были разделены на 28 групп (по 3 животных), которым внутримышечно вводили:

- 1) фосфатный буфер (100 мкл), а через неделю фосфатный буфер (100 мкл);
- 2) Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь;
- 3) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 4) Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 5) Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 6) Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 7) Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 8) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 9) Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 10) Ad26-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-del-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 11) Ad26-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-S-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 12) Ad26-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 13) Ad26-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-G-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 14) Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, а через неделю Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;
- 15) фосфатный буфер (100 мкл), а через 3 недели фосфатный буфер (100 мкл);
- 16) Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-null 10⁸ БОЕ/мышь;

- 17) Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 18) Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 19) Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 20) Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 21) Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 22) Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad5-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 23) Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-S-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 24) Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-S-del-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 25) Ad26-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-S-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 26) Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-RBD-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 27) Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-RBD-G-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь;
 28) Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь, а через 3 недели Ad26-RBD-Fc-CoV-2 10^8 БОЕ/мышь.
 Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей

	2 иммунизация	
	с интервалом в 1 неделю	с интервалом в 2 недели
ФСБ/ФСБ	0	0
Ad5-null/ Ad5-null	0	0
Ad5-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2	1:32768	1:41285
Ad5-S-del-CoV-2/ Ad5-S-del-CoV-2	1:41285	1:52016
Ad5-S-Fc-CoV-2/ Ad5-S-Fc-CoV-2	1:82570	1:104032
Ad5-RBD-CoV-2/ Ad5-RBD-CoV-2	1:65536	1:82570
Ad5-RBD-G-CoV-2/ Ad5-RBD-G-CoV-2	1:65536	1:82570
Ad5-RBD-Fc-CoV-2/ Ad5-RBD-Fc-CoV-2	1:65536	1:104032
Ad26-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2	1:26008	1:32768
Ad26-S-del-CoV-2/ Ad26-S-del-CoV-2	1:52016	1:65536
Ad26-S-Fc-CoV-2/ Ad26-S-Fc-CoV-2	1:26008	1:52016
Ad26-RBD-CoV-2/ Ad26-RBD-CoV-2	1:20643	1:26008
Ad26-RBD-G-CoV-2/ Ad26-RBD-G-CoV-2	1:41285	1:52016
Ad26-RBD-Fc-CoV-2/ Ad26-RBD-Fc-CoV-2	1:13004	1:16384

Таким образом, результаты эксперимента подтверждают, что последовательная иммунизация разработанным иммунобиологическим средством приводит к более высоким уровням иммунного ответа, по сравнению с однократной иммунизацией. Специалисту среднего уровня очевидно, что конечная схема иммунизации готовым препаратом опирается на многолетние исследования и часто корректируется непосредственно врачом, она зависит от многих факторов, в том числе от целевой группы пациентов, их возраста, эпидемиологической ситуации и пр.

Пример 14. Способ использования разработанного иммунобиологического средства путем последовательно введения в организм млекопитающих с интервалом в одну неделю в эффективном количестве для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

В данном примере описан способ использования разработанного иммунобиологического средства основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа и рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, путем их последовательного введения в организм млекопитающих с интервалом в 1 неделю для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7.

Все животные были разделены на 9 групп (по 5 животных), которым внутримышечно вводили:

1) фосфатный буфер (100 мкл), затем через неделю фосфатный буфер (100 мкл), затем через неделю фосфатный буфер (100 мкл);

2) Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-null 10^8 БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-

null 10⁸ БОЕ/мышь;

3) Ad26-null 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-null 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-null 10⁸ БОЕ/мышь;

4) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

5) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

6) Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

7) Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

8) Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь;

9) Ad26-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь, затем через неделю Ad5-S-CoV-2 10⁸ БОЕ/мышь.

Результаты представлены в табл. 11.

Таблица 11

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей

Группа животных	Титр антител
ФСБ/ФСБ/ФСБ	0
Ad5-null/ Ad5-null/ Ad5-null	0
Ad26-null/ Ad26-null/ Ad26-null	0
Ad5-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2	1:150562
Ad5-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2	1:301124
Ad5-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2	1:228209
Ad26-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2	1:172950
Ad26-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2/ Ad26-S-CoV-2	1:262144
Ad26-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2/ Ad5-S-CoV-2	1:301124

Таким образом, результаты данного эксперимента на примере разработанного иммунобиологического средства основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го или 26-го серотипа, содержащего оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих последовательность белка S SARS-CoV-2 показали, что 3-кратное последовательное введение любых вариантов данного средства приводит к более сильному иммунному ответу на антиген, по сравнению с однократным и двукратным введением. Специалисту среднего уровня очевидно, что разработанное иммунобиологическое средство можно вводить многократно, что будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта. Необходимое количество иммунизаций может отличаться в зависимости от целевой категории населения (их национальной принадлежности, возраста, работы и пр). Кратность иммунизации определяется также экономической целесообразностью.

Пример 15. Способ использования разработанного иммунобиологического средства путем однократного введения в организм млекопитающих различными способами в эффективном количестве для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

В данном примере описан способ использования разработанного иммунобиологического средства основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа и рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, путем их однократного введения в организм млекопитающих 3 способами (интраназально, подкожно, внутримышечно) для индукции специфического иммунитета к SARS-CoV-2.

Эксперимент был выполнен согласно протоколу, описанному в примере 7.

Все животные были разделены на 15 групп (по 3 животных), которым вводили:

- 1) ФСБ интраназально;
- 2) ФСБ подкожно;
- 3) ФСБ внутримышечно;
- 4) Ad5-null 10⁹ БОЕ/мышь интраназально;
- 5) Ad5-null 10⁹ БОЕ/мышь подкожно;
- 6) Ad5-null 10⁹ БОЕ/мышь внутримышечно;
- 7) Ad26-null 10⁹ БОЕ/мышь интраназально;
- 8) Ad26-null 10⁹ БОЕ/мышь подкожно;
- 9) Ad26-null 10⁹ БОЕ/мышь внутримышечно;
- 10) Ad5-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь интраназально;
- 11) Ad5-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь подкожно;
- 12) Ad5-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь внутримышечно;
- 13) Ad26-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь интраназально;
- 14) Ad26-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь подкожно;
- 15) Ad26-S-CoV-2 10⁹ БОЕ/мышь внутримышечно.

Результаты представлены в табл. 12.

Таблица 12

Титр антител к белку S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей

Группа животных	Титр антител
ФСБ интраназально	0
ФСБ подкожно	0
ФСБ внутримышечно	0
Ad5-null интраназально	0
Ad5-null подкожно	0
Ad5-null внутримышечно	0
Ad26-null интраназально	0
Ad26-null подкожно	0
Ad26-null внутримышечно	0
Ad5-S-CoV-2 интраназально	1:16384
Ad5-S-CoV-2 подкожно	1:26008
Ad5-S-CoV-2 внутримышечно	1:57052
Ad26-S-CoV-2 интраназально	1:13004
Ad26-S-CoV-2 подкожно	1:24300
Ad26-S-CoV-2 внутримышечно	1:43238

Таким образом, результаты данного эксперимента подтверждают возможность использования разработанного иммунобиологического средства для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 путем его интраназального, внутримышечного или подкожного введения.

Промышленная применимость

Преимуществом заявленного технического решения является использование таких доз рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих ген полноразмерного белка, которые позволяют повысить иммуногенность, но при которых еще не наблюдаются токсические эффекты на животных. Также к преимуществам можно отнести дополнительное возрастание иммуногенности рецептор-связывающего домена гена S вируса SARS-CoV-2 за счет присоединения лидерной последовательности для секреции белка из клетки во внешнюю среду. Одним из преимуществ заявленного технического решения является наличие адекватного Т-клеточного ответа (как CD4+, так и CD8+) на введение антигена.

Таким образом, создано иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, содержащее аденовирус человека 5-го серотипа с делетированными E1/E3 областями и встроенную генетическую конструкцию, кодирующую разработанные оптимальные аминокислотные последовательности протективного антигена S вируса SARS-CoV-2.

Также, создано иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее аденовирус человека 26-го серотипа с делегированными E1/E3 областями, замененной открытой рамкой считывания 6 на открытую рамку считывания аденовируса человека 5-го серотипа и с встроенной генетической конструкцией, кодирующей разработанные оптимальные аминокислотные последовательности протективного антигена S вируса SARS-CoV-2. При этом кодирующие последовательности различных форм белка S вируса SARS-CoV-2 экспрессируются рекомбинантными псевдоаденовирусными частицами непосредственно в организме субъекта.

Разработанное иммунобиологическое средство может рассматриваться в качестве препарата для доклинических исследований, как противовирусная вакцина, которая способна эффективно защищать человека от заражения коронавирусом SARS-CoV-2. Предложена технология производства такой вакцины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2, на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую протективный антиген S вируса SARS-CoV-2 с делецией 18 аминокислот на C'-конце гена SEQ ID NO: 2.

2. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2, на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую полный протективный антиген S вируса SARS-CoV-2 и последовательность Fc-фрагмента от человеческого IgG1 SEQ ID NO: 3.

3. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2, на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида вируса SEQ ID NO: 4.

4. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого

респираторного синдрома SARS-CoV-2, на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2 с трансмембранным доменом гликопротеина вируса везикулярного стоматита SEQ ID NO: 5.

5. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2, на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2 с последовательностью лидерного пептида и последовательностью Fc-фрагмента от человеческого IgG1 SEQ ID NO: 6.

6. Иммунобиологическое средство для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа или рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа, содержащее оптимизированную под экспрессию в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность, кодирующую полный протективный антиген S вируса SARS-CoV-2 SEQ ID NO: 1 в комбинации по меньшей мере с одним иммунобиологическим средством по любому из пп.1-5.

7. Способ индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих по меньшей мере одного иммунобиологического средства по любому из пп.1-6 в эффективном количестве.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что последовательно вводят в организм млекопитающих два различных иммунобиологических средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа по любому из пп.1-6 или два различных иммунобиологических средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа по любому из пп.1-6 с интервалом более чем в 1 неделю.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что последовательно вводят в организм млекопитающих иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа по любому из пп.1-6 и иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа по любому из пп.1-6 с интервалом более чем в 1 неделю.

10. Способ по п.7, отличающийся тем, что последовательно вводят в организм млекопитающих иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа по любому из пп.1-6 и иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа по любому из пп.1-6 с интервалом более чем в 1 неделю.

11. Способ по п.7, отличающийся тем, что одновременно вводят в организм млекопитающих любые два иммунобиологических средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа по любому из пп.1-6 или 26-го серотипа по любому из пп.1-6.



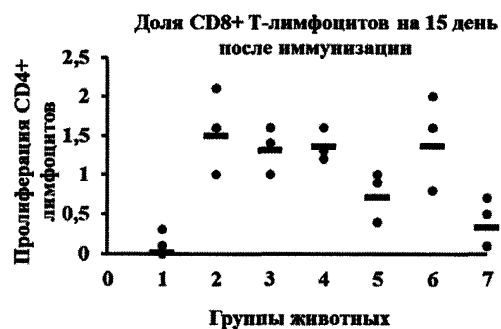
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

