

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092658** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(22) Дата подачи заявки
2020.12.03

(51) Int. Cl. *C07K 14/165* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(54) **ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

(96) 2020000126 (RU) 2020.12.03

(71) Заявитель:
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; ОРЛОВ АНТОН
ИОСИФОВИЧ; АЛЕКСЕЕВ
АЛЕКСЕЙ ВИКТОРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:
**Духовлинов Илья Владимирович,
Федорова Екатерина Алексеевна,
Колмаков Николай Николаевич,
Чирак Евгений Леонидович, Орлов
Антон Иосифович, Алексеев Алексей
Викторович (RU)**

(74) Представитель:
Федорова Е.А. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для осуществления профилактики и лечения коронавирусной инфекции, главным образом, вызываемой 2019-nCoV. Предложена вакцина на основе генетической конструкции, кодирующей гибридный белок, включающий фрагменты белков M, S, N, E нового коронавируса, а также в одном из вариантов дополнительно содержащая такой гибридный белок. Преимущества разработанной вакцины - быстрота и простота получения (от 2-3 ч); безопасность, за счет природы действующего вещества, а также отсутствия полного сайта связывания с ACE2 у синтезируемого с генетической конструкцией гибридного белка, отсутствия его гомологии с белками организма; индукция профиля иммунного ответа, в немалой степени представленного цитотоксическим иммунным ответом, помимо гуморального; отсутствие затруднения диагностики 2019-nCoV; противоопухолевая активность; действие также против мутировавшего вируса.

A1

202092658

202092658

A1

Вакцина для профилактики и лечения коронавирусной инфекции

Описание

Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для осуществления профилактики и лечения коронавируса.

Коронавирусы (КоВ) – многочисленное семейство вирусов, вызывающих болезнь от бытовой простуды до более серьезных заболеваний, таких как ближневосточный респираторный синдром (БВРС-КоВ) и тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС-КоВ). Новый коронавирус (нКоВ, COVID-19, SARS-CoV-2) – это новый штамм, ранее у человека не выявлявшийся [<https://www.who.int/ru/health-topics/coronavirus/coronavirus>].

Особенностью данного штамма стала быстрая распространяемость, от человека к человеку, а также сложное течение болезни.

Первые случаи заражения COVID-19 зафиксированы в Китае в ноябре 2019 г. Однако уже на 04 марта 2020 г. в мире зарегистрировано в общей сложности 93 090 случаев заболевания COVID-19 и 3198 смертей. Большая часть случаев и смертей – в Китае (80422 и 2984, соответственно), однако случаи коронавируса и смерти от него зафиксированы также в 76 странах мира [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200304-sitrep-44-covid-19.pdf?sfvrsn=783b4c9d_2]. ВОЗ признала коронавирусную инфекцию пандемией.

На 03 апреля 2020 г. в мире зарегистрировано в общей сложности 1 095 904 случаев заболевания COVID-19 и 58 814 смертей. Большая часть случаев и смертей – в США (275 744 и 7 086, соответственно), Италии (119 827 и 14 681, соответственно), Испании (119 199 и 11 198, соответственно), Германии (91 159 и 1 275, соответственно), в Китае (81 620 и 3 322, соответственно). На 22 ноября 2020 г. в мире зарегистрировано в общей сложности уже 58,5 миллионов случаев заболевания COVID-19 и порядка 1,4 млн смертей. Большая часть случаев и смертей – в США (12 млн и 260 тыс., соответственно), Индии (9 млн и 133 тыс., соответственно), Бразилии (6 млн и 169 тыс., соответственно). Случаи коронавируса и смерти от него зафиксированы уже в 218 странах и территориях мира [<https://www.worldometers.info/coronavirus/>]. Очевидно, что темпы распространения инфекции крайне высокие, несмотря на принимаемые меры.

Учитывая, что ежегодно в мире от осложнений, вызванных сезонными вирусами гриппа, умирает от 290 000 до 650 000 человек [<https://www.worldometers.info/coronavirus/>], число погибших от нового коронавируса значительно выше и выше даже числа умерших от заболеваний, связанных с ВИЧ (1,1 млн) и сравнимо с числом погибших от гепатита (1,3

млн), туберкулеза (1,4 млн), в 2015 году [<https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/v-4-17162-world-health-statistics-2017.pdf>].

Среди наблюдаемых у заболевших состояний – ОРВИ, острое повреждение почек, сердечная недостаточность, дисфункция печени, аритмия, нередок летальный исход. Многим пациентам требовалась внешняя поддержка функции дыхания [Arabi, Y.M., Murthy, S. & Webb, S. COVID-19: a novel coronavirus and a novel challenge for critical care. *Intensive Care Med* (2020)]. Летальный исход на данный момент наблюдается у 3% [https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm_campaign=homeAdUOA?Si].

2019-nCoV - это вирус, оказывающий серьезное воздействие на здоровье населения, экономику и социально-политические вопросы. Сдерживание COVID-19 должно быть главным приоритетом для всех стран [<https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mission-briefing-on-covid-19---4-march-2020>].

Поскольку это новое инфекционное заболевание, то на сегодняшний день зарегистрированной вакцины против нового коронавируса, прошедшей все 4 фазы клинических исследований, нет.

Также существует острая неудовлетворенная потребность в оптимальном лечении, включая специфическую противовирусную терапию, изучении роли модуляции иммунной системы и как лучше всего обеспечить поддержку отказавших систем органов. На момент написания указанной выше статьи Arabi Y.M. и соавторов было зарегистрировано более 160 рандомизированных и неслучайных исследований [<http://www.chictr.org.cn/searchprojen.aspx> и <http://apps.who.int/trialsearch/default.aspx>]. Для лечения COVID-19 используют различные средства, включая кортикостероиды, различные комбинации рибавирина, лопинавира/ритонавира, хлорохина, гидроксихлорохина, интерферонов и других агентов. Проводится РКИ с использованием ремдесивира при тяжелом течении COVID-19 (NCT04257656). [Arabi, Y.M., Murthy, S. & Webb, S. COVID-19: a novel coronavirus and a novel challenge for critical care. *Intensive Care Med* (2020)]. Лечение осуществляют также с использованием средств народной медицины.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание вакцины против коронавируса, безопасной, быстрой и простой при производстве и применении, которая имела бы эффективность и низкую стоимость, и которую можно применить и для профилактики, и лечения коронавируса, особенно нового коронавируса.

Из всех направлений разработки новых вакцин авторы настоящей группы изобретений считают наиболее перспективным использование вакцин, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Однако их эффективность варьирует и

обуславливается массой факторов, одними из самых важных из которых являются подбор компонентов и их форма (структура).

Для создания настоящего изобретения были выбраны фрагменты антигенов коронавируса – белков M, S, N, E нового коронавируса. На их основе разработан гибридный белок. Компоненты гибридного белка соединены гибкими мостиками, что позволяет достигать полноценного функционирования каждого компонента белка. Разработанный белок эффективен также против SARS за счет перекрестной активности.

Важно, что разработанный гибридный белок за счет своей структуры не имеет гомологии с известными белками других организмов, кроме коронавируса, что обеспечивает специфичность их действия.

Важно, чтобы вакцина была специфически иммуногенна и протективна против коронавируса, и при этом безопасна также с точки зрения того, что не будет вызывать осложнения, вызываемые коронавирусом, а также иные побочные эффекты.

Важной особенностью вируса COVID-19 является то, что субъединица S1 (aa01–aa550) его гликопротеина S имеет RBD (рецептор-связывающий домен), который взаимодействует с рецептором клетки-хозяина, ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2). Проникновение коронавируса в клетку-хозяина и его захват происходит главным образом за счет N-концевого домена S1. Казалось бы, использование этого фрагмента как мишени для выработки иммунного ответа могло бы быть важным для блокирования проникновения вируса. Однако, при формировании антител к данному фрагменту, есть вероятность захвата ими молекул, и в результате недостаточности проникновения таких молекул организма в необходимые ткани, в результате эффект от такой вакцинации может быть совершенно небезопасным, за счет чего могут развиваться указанные выше серьезные осложнения. Соответственно, использование вакцин, содержащих такой фрагмент, т.е. вакцин на основе ослабленного или убитого нового коронавируса, рекомбинантных вакцин, содержащих такой фрагмент белка S, является потенциально небезопасным.

Именно поэтому в разработанном нами гибридном белке использован иной фрагмент субъединицы S1 гликопротеина S, который позволит сформировать иммунный ответ в том числе на гликопротеин S, в том числе предотвратить проникновение вируса, однако не вызовет нарушение функционирования систем организма, в том числе сердечно-сосудистой и дыхательной.

Нами предложена вакцина для профилактики и лечения коронавируса у человека или животного, содержащая генетическую конструкцию в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор. Генетическая конструкция кодирует описанный выше гибридный белок.

Также предложена вакцина для профилактики и лечения коронавируса у человека или животного, содержащая дополнительно описанный выше гибридный белок или гибридный белок, также содержащий фрагменты антигенов коронавируса – белков M, S, N, E нового коронавируса, немного короче описанного выше гибридного белка.

Аналоги предлагаемой нами вакцины не выявлены. Вакцины на основе убитых или аттенуированных штаммов коронавируса аналогами не считаем, ввиду значительно меньшей безопасности, в том числе обусловленной наличием полноразмерного белка S. Все виды вакцин, не содержащих живые микроорганизмы, являются более безопасными не только из-за отсутствия рисков инфицирования, но и из-за отсутствия рисков развития побочных явлений у людей с мутациями в генах, обуславливающих строение молекул, ключевых для корректного функционирования иммунной системы. Однако и с ними важно не вызвать формирование побочных эффектов, в том числе описанных выше, в том числе за счет наличия полноразмерного белка S или N-концевого фрагмента его субъединицы S1.

Технический результат от использования изобретения выражается, в первую очередь, в значительном ускорении производства вакцины, благодаря простому, с наименьшими требованиями, процессу получения действующего агента вакцины. С учетом распространяющейся стремительно инфекции скорость получения вакцины играет ключевую роль в победе над инфекцией, но также имеет экономический эффект – при карантинных мерах за несколько месяцев экономика впадёт в сильнейший упадок, и только быстрая и эффективная вакцинация в кратчайшие сроки сможет позволить снять ограничения и не дать экономике прийти в сильный упадок.

Технический результат от использования вакцины также заключается в действии также против мутировавшего вируса. Достигается благодаря отсутствию в структуре полного домена S-белка, связывающегося с рецептором на поверхности клетки (с ACE2).

Технический результат от использования вакцины также заключается в увеличении безопасности вакцины.

Указанный технический результат достигается, главным образом, тем, что синтезируемый гибридный белок по изобретению не содержит фрагменты, гомологичные фрагментам молекул организма.

Указанный технический результат достигается тем, что в качестве действующего вещества используется ДНК, которая существует в виде эписомы и не интегрируется в геном, с которой синтезируется и в одном из вариантов затем секретируется из клетки белок.

Указанный технический результат также достигается тем, что используемая ДНК не реплицируется после введения в организм млекопитающего, что позволяет осуществлять контроль над количеством синтезируемого белка, и, соответственно, над эффектом.

Указанный технический результат достигается и за счет наличия в используемой ДНК таких регуляторных последовательностей, как сайленсер и/или инсулятор, в одном из вариантов изобретения, благодаря чему также осуществляется контроль над синтезом белка и, соответственно, над эффектом: при необходимости есть возможность в короткий срок остановить, либо уменьшить экспрессию гена.

Указанный технический результат также достигается тем, что инфекционный агент как таковой не используется при производстве.

Указанный технический результат достигается в том числе в одном из вариантов тем, что используемый полинуклеотид содержит точные фрагменты генов, кодирующих белки коронавируса, соответственно действие такой генетической конструкции не будет неожиданным.

Технический результат выражается и в повышенной иммуногенности такой вакцины за счет природы используемых молекул. Так, показано, что сама по себе ДНК, наряду с введением иглой, действует как адъювант, что опосредует презентацию синтезируемых целевых антигенов, главным образом, с помощью МНС первого класса, что индуцирует, в свою очередь, формирование цитотоксического ответа. Также показано, что синтез одного внутриклеточного белка в больших количествах может способствовать активной презентации миофибриллами с помощью МНС первого класса [Hartikka J. et al. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle // Hum. Gene Ther. 1996. Vol. 7, № 10. P. 1205–1217].

Технический результат от использования вакцины также заключается в том, что не затрудняется диагностика нового коронавируса существующими тест-системами. То есть после вакцинации тест на антитела не дает ложноположительных результатов, в отличие от вакцин, содержащих полноразмерный S - белок. Причина такого эффекта в том, что иммунный ответ вырабатывается на фрагменты белков коронавируса вакцины, на которые он не вырабатывается при встрече с вирусом, либо при введении вакцин, основанных на S-белке. На формировании такого иммунного ответа основана и эффективность вакцины.

Технический результат от использования вакцины также заключается в универсальности средства – и для профилактики, и лечения, и новой коронавирусной инфекции, и SARS. Достигается тем, что формируется безопасный для организма иммунный ответ, в котором развит цитотоксический ответ вкупе с гуморальным. Также достигается тем, что вакцина помогает иммунной системе корректно нацелиться – на

конкретные фрагменты коронавируса, и коронавирус не остается незамеченным иммунной системой и элиминируется специфическим ударом.

Технический результат от использования вакцины на основе генетической конструкции по изобретению заключается также в повышенной эффективности благодаря тому, что гибридный белок длительно с нее синтезируется, причем в течение от нескольких дней до нескольких недель, в зависимости от строения используемой генетической конструкции. Также он достигается строением кодируемого гибридного белка.

Технический результат от использования вакцины на основе генетической конструкции также заключается в упрощении и удешевлении производства вакцины за счет избегания производства и процессов очистки белковых препаратов *in vitro* благодаря тому, что синтез белка происходит *in vivo*. Производство, очистка и хранение ДНК-препаратов экономически выгодно, они стабильны, их можно нарабатывать в больших количествах с меньшими затратами.

Технический результат от использования вакцины, содержащей дополнительно гибридный белок, заключается также в повышенной эффективности. Он достигается благодаря тому, что белковый компонент усиливает антигенность вакцины и ускоряет ее действие.

Технический результат от использования вакцины по изобретению, содержащей плазмидную ДНК, заключается также в противоопухолевом эффекте за счет наличия в структуре используемой генетической конструкции CpG-последовательностей. Учитывая повышенную нагрузку на учреждения здравоохранения и накладку с помощью онкобольным, такой эффект вакцины будет крайне востребован.

Технический результат также заключается в расширении спектра действующих веществ и вакцин на их основе против коронавируса. При нежелании использовать аналоги ввиду их вышеописанных недостатков, либо при противопоказаниях к применению аналогов, либо при отсутствии доступа к ним данное действующее вещество или вакцина позволит осуществить защиту против коронавируса. Указанный технический результат достигается тем, что используют действующее вещество или вакцину по настоящему изобретению.

В условиях пандемии крайне важно быстро и масштабно внедрять вакцинацию, поскольку это единственный способ защитить от распространения и тяжелого течения болезни, летальных исходов, а также снизить нагрузку на медицинские учреждения для доступности медицинской помощи для нуждающихся пациентов с иными болезнями или состояниями. Предложенная вакцина на данный момент удовлетворяет данному требованию, помимо высокой безопасности.

Нами предложен способ получения вакцины по изобретению, заключающийся в том, что амплифицируют генетическую конструкцию – линейный фрагмент ДНК - с использованием ПЦР, очищают и смешивают с физиологически приемлемым носителем и буферным раствором.

Технический результат от использования способа получения разработанной вакцины – в получении вакцины в кратчайшие сроки. Так, процесс получения очищенного препарата генетической конструкции - линейного фрагмента ДНК – активного агента вакцины - занимает всего несколько часов (от 2-3 часов)! Ни один иной тип вакцины против коронавируса невозможно получить в такие краткие сроки.

Технический результат также заключается в простоте получения вакцины. Он достигается тем, что для производства такой вакцины не требуется разработка многоступенчатой технологии производства, не требуется длительной наладки стадий процесса, требуется минимальный набор реагентов, которые легкодоступны, не требуются допуски к работе с патогенными организмами, не требуются значительные вложения в строительство, ремонт помещений и оборудование. Такой способ возможно осуществить даже в стандартной лаборатории, занимающейся работой с ДНК.

Предложена генетическая конструкция, включающая полинуклеотид, кодирующий разработанный гибридный белок, и элементы, позволяющие осуществить экспрессию полинуклеотида в клетках целевого организма. Целевой организм – человек или животное. Генетическая конструкция может быть представлена плазмидной ДНК для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, вектором на основе вируса, линейным фрагментом ДНК, содержащими полинуклеотид по изобретению.

Технический результат заключается, главным образом, в индукции иммунного ответа, не вызывающего побочных явлений, связанных с использованием иных фрагментов белка S нового коронавируса, либо полноразмерного такого белка, в генетических конструкциях, либо штаммах коронавируса.

Технический результат заключается в значительном ускорении и упрощении получения действующего вещества вакцины от коронавируса – генетической конструкции. Это достигается, в первую очередь, безопасностью используемых типов генетических конструкций и соответственно отсутствием жестких требований к работе с ними.

Технический результат заключается также в том, что генетическая конструкция служит матрицей для проведения ПЦР для получения вакцины по изобретению.

Кроме того, технический результат заключается в увеличении длительности синтеза кодируемого белка и достигается тем, что нуклеотидная последовательность, включающая фрагмент, кодирующий целевой белок, содержит элементы, обуславливающие

стабильность мРНК и, соответственно, увеличивающие время полужизни мРНК, в результате синтез белка с одной молекулы мРНК осуществляется большее количество раз, а также в результате увеличивается количество синтезируемого белка; а также тем, что нуклеотидная последовательность гибридного белка оптимизирована по кодонному составу для экспрессии в клетках целевого организма – человека и животного, млекопитающих, в результате синтез белка идет интенсивнее. Последовательность нового коронавируса сама по себе является оптимизированной по кодонному составу для экспрессии в млекопитающих, а также оптимизация может быть осуществлена независимо, с использованием программного обеспечения.

При внедрении в практику это позволит использовать крайне малое количество вводимой плазмидной ДНК.

Технический результат заключается также в расширении спектра генетических конструкций для синтеза иммуногенных коронавирусаных антигенов в организме.

Предложен полинуклеотид, кодирующий гибридный белок, включающий фрагменты белков М, S, N, Е коронавируса, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1. Полинуклеотид может также содержать фрагмент, кодирующий гетерологичную секреторную последовательность.

Технический результат от использования предлагаемого нами полинуклеотида – главным образом, в получении генетической конструкции, благодаря использованию которой в вакцине у человека или животного формируется специфичный протективный иммунный ответ на коронавирус, главным образом, на новый коронавирус.

Технический результат от использования предлагаемого нами полинуклеотида заключается также в расширении спектра полинуклеотидов для синтеза иммуногенных коронавирусаных антигенов в организме.

Предложена прокариотическая рекомбинантная клетка для получения генетической конструкции по изобретению – продуцент.

Технический результат от использования продуцента разработанной генетической конструкции – в стабильном хранении и воспроизведении генетической конструкции, а также в получении разработанной генетической конструкции.

Полинуклеотид, генетическая конструкция, продуцент генетической конструкции, способ получения вакцины – все эти объекты используют для получения вакцины по изобретению.

В связи с тем, что проблема нового коронавируса стоит очень остро, а выведение на рынок препарата удастся не многим, и реальную протективность покажет только время, данная группа изобретений позволит увеличить шансы в борьбе с данной инфекцией.

Подробное описание изобретения

Предложена группа изобретений: гибридный белок, полинуклеотид, генетическая конструкция, рекомбинантная клетка, вакцина на основе генетической конструкции для профилактики и лечения коронавируса, которая также может содержать гибридный белок, способ ее получения.

Разработан гибридный белок, который включает иммуногенные фрагменты белков М, S, N, Е коронавируса, соединенные гибкими мостиками, белок охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1. Особенностью белка является то, что он не имеет гомологии с белками иных организмов, чем коронавируса, а также не содержит полноразмерный сайт связывания с ACE2. Это обуславливает важное преимущество вакцины на его основе – дополнительный аспект безопасности вакцины. Такой белок будет синтезироваться в клетках целевого организма – человека или животного, - с предложенной генетической конструкции, содержащей предложенный полинуклеотид. Также такой белок содержится и в одном из вариантов вакцины.

Предложен полинуклеотид, кодирующий разработанный гибридный белок. При известности аминокислотной последовательности белка специалист в данной области сможет получить нуклеотидную последовательность для синтеза в клетках целевого организма. Это может быть как основанная на фрагментах природной нуклеотидной последовательности белков вируса, так и оптимизированная искусственно по кодонному составу последовательность. Кодонную оптимизацию можно проводить самостоятельно, используя информацию о частоте встречаемости кодонов у целевого организма, например, в базе данных [например, Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):292], либо с использованием специализированных программ, например, представленной на сайте <http://www.encorbio.com/protocols/Codon.htm> или molbiol.ru или иных ресурсах.

Полинуклеотид может не содержать (например, SEQ ID NO.:2) или содержать (например, из SEQ ID NO.:3-5) гетерологичную секреторную последовательность, оптимизированную по кодонному составу для целевого организма – например, таковую ТРА (tissue-type plasminogen activator), ГРЧ (гормон роста человека), ИГФ (инсулиноподобный фактор роста), ЕРО (эритропоэтина), но ими не ограничиваясь. В случае без секреторной последовательности иммунный ответ будет наиболее сдвинут в

сторону цитотоксического. В другом случае, помимо цитотоксического, также будет в значительной степени индуцирован гуморальный - антительный иммунный ответ. Поскольку, особенно в условиях сложности тестирования на коронавирус, сложно оценить, заражен ли человек, то явным преимуществом предлагаемой вакцины является индукция профиля иммунного ответа, где цитотоксический ответ проявлен значительно, в отличие от иммунного ответа, формирующегося на вводимый только белковый антиген или вирусную частицу SARS-CoV2. То есть оба варианта полинуклеотида являются подходящими.

Предложена генетическая конструкция. Каждая конструкция включает, помимо полинуклеотида, элементы, позволяющие осуществить экспрессию полинуклеотида в клетках целевого организма. За счет того, что действующим веществом вакцины является именно генетическая конструкция, с которой осуществляется синтез антигена, возможно получить профиль иммунного ответа, в котором немалую роль сыграет цитотоксический иммунный ответ, однако и антительный ответ также будет формироваться. Также благодаря длительности синтеза антигена в организме и при этом отсутствии инфекционности, вероятность вызвать формирование иммунного ответа, адекватного, с формированием иммунологической памяти, возрастает. Сама по себе молекула также обладает адъювантным действием.

Под генетической конструкцией подразумевается прежде всего линейный фрагмент ДНК или рекомбинантный вектор, который может быть представлен вирусным, либо плазмидным вектором.

Рекомбинантный вектор должен содержать существенные для организмов его поддержания и использования элементы, вкуче с соответствующими регуляторными последовательностями. Регуляторные последовательности – нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования рекомбинантного вектора.

Существенными для прокариотической системы являются ориджин репликации, для поддержания в клетке со средней, предпочтительно высокой, копийностью, и маркерный ген для возможности селекции штамма-производителя. Бактериальные элементы плазмидной ДНК не должны отрицательно влиять на экспрессию в клетках млекопитающих и обуславливать побочный эффект от применения плазмидной ДНК. Подходящий ориджин репликации представлен pM1 (der.), ColE1 (der.) и F1, pUC и F1, но не ограничивается ими. Подходящий маркерный ген представлен репортерным геном или геном устойчивости к антибиотику, например, ампициллином, преимущественно канамицином, но не ограничивается ими. В литературе имеются данные о том, что использование гена

устойчивости к ампициллину в качестве маркерного гена может быть нежелательным в связи с развитием реакции у пациентов на ампициллин, что связано с качеством очистки ДНК, но не самим элементом.

Существенными элементами рекомбинантного вектора для использования у млекопитающих являются элементы для эффективного функционирования, для экспрессии закодированного гена, - промотор, в том числе сигналы инициации транскрипции, лидерная последовательность мРНК, терминирующая последовательность, регуляторные последовательности.

Промотор является важным компонентом вектора, который запускает экспрессию интересующего гена. Классические промоторы для рекомбинантных векторов - компонентов препаратов — это CMV человека/ немедленно-ранний или CMV-chicken- β actin (CAGG) промотор. Промоторы CMV используются для большинства ДНК-вакцин, так как они опосредуют высокие уровни конститутивной экспрессии в широком диапазоне тканей млекопитающих [Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum. Gene Ther. 1993;4(4):419–431] и не подавляют прочитывание downstream. Увеличение уровня экспрессии наблюдают при изменении CMV промотора, например, включением HTLV-1R-U5 downstream от промотора цитомегаловируса или при использовании химерного SV40-CMV промотора [Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. Biotechnol. Adv. 2009;27(4):353–370]. Альтернативой CMV промоторам служат тканеспецифические промоторы хозяина, которые позволяют избежать конститутивной экспрессии антигенов в неподходящих тканях [Cazeaux N, Bennasser Y, Vidal PL, Li Z, Paulin D, Bahraoui E. Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. Vaccine. 2002;20(27–28):3322–3331].

Промотор может быть с соответствующими регуляторными последовательностями из природных промоторов со своими регуляторными элементами (CaM kinase II, CMV, nestin, L7, BDNF, NF, MBP, NSE, p-globin, GFAP, GAP43, тирозингидроксилаза, субъединица 1 каинатного рецептора и субъединица В глутаматного рецептора и другие), либо синтетических промоторов с регуляторными последовательностями, для получения необходимого характера экспрессии (соотношения продолжительности и уровня экспрессии) целевого гена на уровне транскрипции.

Возможные регуляторные последовательности по отношению к промотору:

- энхансер, для увеличения уровня экспрессии через улучшение взаимодействия РНК-полимеразы и ДНК.

- инсулятор, для модулирования функций энхансера,

- сайленсеры, либо их фрагменты, для снижения уровня транскрипции, например, для тканеспецифической экспрессии,

- 5' нетранслируемая область до промотора, включая интрон.

Регуляторные последовательности – нуклеотидные последовательности, способные повлиять на экспрессию гена на уровне транскрипции и/или трансляции, а также на механизмы, обеспечивающие существование и поддержание функционирования генетической конструкции. Рекомбинантный вектор - плазмидная или вирусная ДНК по настоящему изобретению - содержит от одной из вышеприведенных регуляторных последовательностей, в зависимости от варианта ДНК, основанного на выборе промотора и желаемых параметрах экспрессии целевого гена. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты таких элементов и их использования, рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может содержать любые отвечающие вышеуказанным условиям комбинации, при которых с него осуществляется синтез разработанного гибридного белка в клетках целевого организма – человека или животного. При использовании сайленсера, либо инсулятора в составе конструкции возможно регулировать экспрессию целевого гена.

Иные регуляторные последовательности:

- нетранслируемая область downstream от промотора, включая интрон, для повышения стабильности мРНК и увеличения экспрессии целевого гена.

Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению в одном из вариантов дополнительно содержит такой регуляторный элемент.

Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению содержит и такой важный элемент, как лидерную последовательность мРНК, содержащую сигналы инициации трансляции, старт-кодон. Сигналы инициации трансляции - последовательность Козак у эукариот [Kozak M. (1986) "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes", Cell 44, 283-292].

Рекомбинантный вектор также содержит сайт, преимущественно сайты, разные, для клонирования целевого гена, для осуществления правильной ориентации целевого гена в рекомбинантном векторе, и сайт, преимущественно сайты, для посадки праймеров для его секвенирования.

Рекомбинантный вектор содержит и описанный выше полинуклеотид.

Рекомбинантный вектор также содержит терминирующую последовательность, содержащую последовательно стоп-кодон, 3' нетранслируемую область с сигналом и сайтом полиаденилирования, стоп-кодон, за счет которой сохраняется стабильность мРНК, и осуществляется надлежащее прекращение транскрипции и экспорт мРНК из ядра. На экспрессию генов можно повлиять путем изменения терминирующей последовательности, которая необходима для сохранения стабильности мРНК, надлежащего прекращения транскрипции и экспорта мРНК из ядра, в том числе ее укорачиванием. Во многих современных ДНК-вакцинах используют последовательность терминатора транскрипции бычьего гормона роста [Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, et al. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 1993;12(9):777–783]. Полиаденилирование (полиА) необходимо для стабилизации транскрипта. Изменение последовательности полиА может привести к увеличению уровня экспрессии гена [Norman JA, Hobart P, Manthorpe M, Felgner P, Wheeler C. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. *Vaccine.* 1997;15(8):801–803]. В плазмиде pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) область терминатора бычьего гормона роста содержит область гомопурина, которая чувствительна к нуклеазе. Показано, что альтернативная полиА последовательность может значительно улучшить стабильность плазмиды к нуклеазе [Azzoni AR, Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DMF. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med.* 2007;9:392–402]. Введение двух стоп-кодонов перед 3' нетранслируемой областью позволяет увеличить эффективность терминатора транскрипции. Опираясь на существующий уровень техники, на известные и очевидные варианты такого элемента, рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может содержать любую отвечающую вышеуказанным условиям терминирующую последовательность, при которой с него осуществляется синтез целевого белка в клетках человека или животного. Пример терминирующей последовательности для клеток млекопитающих - таковая бычьего гормона роста (BGH).

Могут содержаться и иные элементы, требуемые для функционирования экспрессионной системы.

Предпочтительными рекомбинантными векторами для использования у человека являются векторы, проверенные на людях, содержащие описанные выше элементы с соответствующими регуляторными последовательностями, возможно, модифицированные для соответствия заявленным критериям, что позволяет уменьшить количество требуемых исследований для регистрации средства. Однако возможно и использование иных рекомбинантных векторов, содержащих требуемые описанные элементы.

Проведено множество клинических исследований ДНК-вакцин, продемонстрировавших их безопасность.

На 2019 год количество проведенных клинических исследований в области генной терапии - 3001 шт. [<http://www.abedia.com/wiley/countries.php>], в том числе 184 исследования проведено в отношении инфекционных заболеваний. При этом 15% всех клинических исследований в области генной терапии проведено в отношении агентов на основе плазмидной ДНК, 8% - на основе аденоассоциированного вируса. Таким образом, данное направление является реальным и внедряемым.

В руководстве FDA (2007) заявлено, что исследования биораспределения вещества после его введения в организм могут быть отменены для ДНК-вакцин, производимых клонированием нового гена в плазмидный вектор, в отношении которого ранее документально установлено приемлемые биораспределение и профиль интеграции. В руководстве ВОЗ (2007) заявлено, что исследования биологического распределения и сохранения требуются, если еще не имеется значительный опыт работы с почти идентичным или аналогичным продуктом. В руководстве ЕМЕА (2006) заявлено, что опыт работы с векторной системой позволит оптимизировать и сфокусироваться на доклинических исследованиях. Исследования по безопасности с использованием ДНК-векторов с различными клонированными генами продемонстрировали аналогичное биораспределение [Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Duffy C, Nason M, Andrews C, Kong WP, Nabel GJ, Gomez PL. Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):610-9. Epub 2006 Mar 28.] и токсикологию [Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Andrews C, Bailer R, Rathmann J, Gomez PL. Toxicological safety evaluation of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):620-30. Epub 2006 Mar 28]. Для плазмидной ДНК для применения у млекопитающих, кроме человека, требования менее строгие, в связи с чем возможно использование более широкого спектра плазмид.

Последовательность расположения описанных элементов в рекомбинантном векторе понятна среднему специалисту в данной области.

Касаемо вектора pCDNA3.1(+), элементы, обеспечивающие экспрессию гена, обуславливающего устойчивость к антибиотику неомицину, а также репликацию плазмиды в виде эписомы в клетках млекопитающих, не функционируют в целевом организме, поскольку такие клетки – клетки организма введения таких плазмидных ДНК - не содержат большой Т-антиген SV40. Векторы pCDNA3.1(+), pVAX, pCMV-3Tag3-a, как и многие

другие плазмидные векторы, не содержат транспозонов, а также элементов, отвечающих за трансмиссивность. Такая ДНК не встраивается в геном и не реплицируется в клетках млекопитающих. Все это безусловно говорит о безопасности применения средств на его основе.

Под вектором на основе вируса, в котором клонирован полинуклеотид, - подразумевается безопасный вектор, такой как, например, рекомбинантный аденоассоциированный вирус, но им не ограничивается.

Под линейным фрагментом ДНК подразумевается фрагмент ДНК, содержащий промотор, лидерную последовательность мРНК, описанный выше полинуклеотид, терминирующую последовательность, в том числе 1 или 2 стоп-кодона, регуляторные последовательности. К элементам применимы описанные выше требования. Такие элементы являются ключевыми, но могут содержаться и иные элементы. С такого фрагмента в клетках целевого организма синтезируется гибридный белок. Последовательность расположения описанных элементов понятна среднему специалисту в данной области.

Синтез с линейного фрагмента ДНК идет менее длительно, чем с плазмидного или вирусного вектора, однако его получение – намного более быстрое. Таким образом, каждая генетическая конструкция имеет свои преимущества и может быть применена в той или иной ситуации. Например, если требуется наработка доз вакцины в кратчайший срок – в течение нескольких часов (от 2-3 ч), то будет использован линейный фрагмент ДНК, если есть больше времени, тогда возможны остальные варианты.

Соответственно предложен способ получения вакцины против коронавируса на основе линейного фрагмента ДНК, который заключается в амплификации линейного фрагмента ДНК с использованием полимеразной цепной реакции - ПЦР, очистке от примесей и смешивании с физиологически приемлемым носителем и буферным раствором. Такой способ получения вакцины является самым быстрым, и ни одна зарегистрированная в России вакцина не нарабатывается таким способом. Однако в условиях такой стремительно распространяющейся инфекции, как коронавирусная инфекция 2020 года, охватившая мир, только такой способ наработки вакцины отвечает брошенному природой вызову.

Вакцину на основе плазмидной ДНК или вирусного вектора возможно получить культивированием микроорганизмов - прокариотической рекомбинантной клетки-продуцента, с последующим выделением и очисткой генетической конструкции. Такой способ займет больше времени (около 4-5 дней), однако он также является быстрым и применимым в настоящих реалиях нового коронавируса.

Вакцину на основе вируса возможно получить культивированием клеток млекопитающих, содержащих вирусный вектор и возможно вспомогательные плазмиды, например, для паковки вирусных частиц, но ими не ограничиваясь, с последующим выделением и очисткой вируса. Такой способ займет больше времени и является более трудоемким и требовательным к чистоте, поскольку клетки млекопитающих нередко контаминируются и другими вирусами, в том числе патогенными. Тем не менее, такой способ также является применимым в настоящих реалиях нового коронавируса.

Вакцину на основе генетической конструкции и гибридного белка получают смешиванием предварительно полученных компонентов.

Все способы являются безопасными как для производства, так и применения вакцины, поскольку препарат новую коронавирусную инфекцию вызвать не может даже гипотетически.

Вакцины на основе мРНК или ослабленных или убитых вирусов – намного сложнее и дольше в производстве, в особенности первый период – разработка технологии получения стабильного и активного агента; сама наработка мРНК, - молекулы, которая менее стабильна, чем ДНК, и обеспечение ее стабильности и активности в ГЛФ; работа с опасным вирусом.

Предложена прокариотическая рекомбинантная клетка для получения генетической конструкции. Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. В одном из вариантов это штамм бактерий *Escherichia coli* DH5a или DH10B/R, содержащий вектор pсDNA3.1(+), pVAX1, или pCMV-3Tag3-a, который содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO.:2-5. Либо вектор pAAVK-EF1 α -MCS.

Предложена вакцина для профилактики и лечения коронавируса, содержащая описанную выше генетическую конструкцию в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор. Фармацевтически приемлемые носители и буферные растворы известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. В качестве потребителя вакцины может выступать как человек, так и животное, в том числе из домашних или сельскохозяйственных животных.

Также предложена вакцина для профилактики и лечения коронавируса, содержащая дополнительно гибридный белок. Гибридный белок включает фрагменты белков М, S, N, Е коронавируса, соединенные гибкими мостиками, и охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1 или 6.

Введение средств, содержащих генетические конструкции (ДНК), кодирующие антиген патогена, как правило, осуществляется в мышечную ткань, и данная конструкция

попадает в соматические клетки, где происходит экспрессия целевого гена. Синтезированный белок экспонируется на поверхности соматической клетки с помощью молекул МНС класса I, что вызывает формирование цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако при введении в состав белка секреторного пептида он, в основном, секретруется во внеклеточное пространство, и реализуется механизм гуморального иммунного ответа.

Авторы предлагают парентеральное введение вакцины, всех вариантов. В одном из вариантов – в случае вакцины на основе вируса – возможны и иные типы введения, например, интраназальное введение, но им не ограничиваясь. Также вакцину по изобретению можно вводить с использованием электропорации, для увеличения эффективности доставки в клетки для экспрессии полинуклеотида.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованного изобретения. Полученные результаты исследований проиллюстрированы примерами (1-3).

Пример 1. Моделирование гибридного белка

Для моделирования белка были произведены следующие действия:

1. Поиск компонентов гибридного белка
2. Построение модели целого белка для определения ориентации доменов
3. Построение моделей для каждого домена (с использованием образцов 3D структур и *ab initio*)
4. Докинг моделей с использованием модели целого белка.

Для получения наиболее реалистичных результатов в автоматическом режиме использовали алгоритм I-Tasser для моделирования белков.

Смоделированный гибридный белок состоит из 482 а.о., с метионином на N-конце – 483 а.о., представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридный белок имеет молекулярную массу 53,5 кДа, pI 8,79, белок стабилен, период полужизни в млекопитающих около 2,8 часов. С метионином на N-конце – 53,7 кДа, pI 8,79, белок стабилен, период полужизни в млекопитающих около 30 часов. При добавлении секреторной последовательности ИГФ (GKISSLPTQLFKCCFCDFLK), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 503 а.о., молекулярная масса 55,9 кДа, pI 8,83, белок стабилен. При добавлении секреторной последовательности ГРЧ (ATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 508 а.о., молекулярная масса 56,2 кДа, pI 8,76, белок стабилен. При добавлении

секреторной последовательности TPA (MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS), гибридный белок состоит из 505 а.о., молекулярная масса 55,9 кДа, pI 8,77, белок стабилен.

При использовании иных секреторных сигналов показатели немного изменяются.

При экспрессии гибридного полинуклеотида в любой клетке синтезируется белок с метионином на N-конце, поскольку трансляция всегда начинается со старт-кодона. Далее метионин может отщепляться естественным путем, например, если белок секретируемый, в составе секреторного пептида.

Гибридный белок, представленный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, состоит из 424 а.о., с метионином на N-конце – 425 а.о.. Анализ аминокислотной последовательности данного белка с помощью программы ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) показал, что гибридный белок имеет молекулярную массу 46,5 кДа, pI 9,61, белок стабилен, период полужизни в млекопитающих около 100 часов. С метионином на N-конце – 46,6 кДа, pI 9,61, белок стабилен, период полужизни в млекопитающих около 30 часов.

Пример 2. Получение высокоочищенных генетических конструкций согласно изобретению

2.1. Получение полинуклеотида, кодирующего гибридный белок

Рассчитывали последовательность нуклеотидов гена, коллинеарную последовательности аминокислот кодируемого им гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO:1, с фланкированием целевого гена сайтами рестрикции, а также с добавлением последовательности Козак перед старт-кодом для инициации трансляции, после старт кодона – в части вариантов - сигнальной последовательности, например, TPA, ГРЧ, ИГФ, ЕРО, либо представленной а.о. MLLLLLLLLLALALA, для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках человека, использован инструмент на сайте molbiol.ru. Получили, например, последовательность, охарактеризованную SEQ ID NO.:4, а также последовательность, содержащую SEQ ID NO.:2.

В одном из вариантов вместо искусственной оптимизации взяли соответствующие нуклеотидные последовательности нового коронавируса для получения генетической конструкции, поскольку эти последовательности экспрессируются у млекопитающих, остальные фрагменты оптимизировали как описано выше. Получили, например, нуклеотидную последовательность, охарактеризованную SEQ ID NO.:3,5.

Рассчитанные нуклеотидные последовательности синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОСЦЕТ, РФ).

2.2. Получение плазмидной ДНК

2.2.1. Создание штамма-продуцента плазмидной ДНК

Синтезированные гены клонировали в эукариотических экспрессионных векторах pVAX1 (Invitrogen), pcDNA3.1+ (Invitrogen), pCMV-3Tag3-a, по рестрикционным сайтам, фланкирующим целевые гены, по инструкции к вектору.

На реакцию лигирования брали 3 мкл раствора синтезированной ДНК, 1 мкл раствора готового вектора, 5 мкл буфера для лигирования $\times 2$ и 1 мкл T4-лигазы. Реакцию проводили при $+20^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов.

После этого смесь прогревали при $+95^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин и очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 мМ ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин.

Затем трансформировали клетки *E.coli* штамма DH10B/R (F-mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M}15$, $\Delta\text{lacX}74$, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara,leu)769, galU, galK λ -, rpsL, nupG) и DH5a (F- $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M}15$ Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -) полученными плазмидными ДНК методом электропорации с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad). В данных штаммах обеспечивается повышенная стабильность вставки гена, предотвращается нежелательная рекомбинация, а также улучшается выход и количество плазмидной ДНК. К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл диализованной лигазной смеси, помещали между электродами порационной ячейки и обрабатывали импульсом тока.

После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин при $+37^{\circ}\text{C}$.

Проводили выявление клонов клеток *E.coli*, содержащих полученную плазмидную ДНК, на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл канамицина, либо ампициллина (в зависимости от плазмиды).

Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования.

Секвенирование клонированных фрагментов проводили по методу Сэнджера.

Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с использованием программ Chromas и BioEdit. Нуклеотидные последовательности исследованных фрагментов ДНК были выровнены относительно рассчитанных, была продемонстрирована

идентичность синтезированных фрагментов рассчитанным. В результате были отобраны клоны клеток *E.coli*, содержащие полноразмерные последовательности целевых генов в составе плазмид - последовательности ДНК, кодирующие разработанный гибридный белок. Такие клоны использовали в качестве штамма-продуцента плазмид по изобретению. Возможные варианты - это штамм бактерий *Escherichia coli* DH10B/R или DH5a, содержащий вектор pVAX1 (Invitrogen), pcDNA3.1+ (Invitrogen) или pCMV-3Tag3-a, который содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO.:2-5.

В качестве продуцента генетической конструкции также успешно использовали клетки бактерии *Bacillus subtilis*.

2.2.2. Нарботка плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок

Отдельную колонию клеток продуцента *E.coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина, либо ампициллина, в зависимости от содержащейся плазмидной ДНК, помещали в 10 мл селективной среды. Клетки растили в течение 12 ч. при +37°C в условиях постоянного перемешивания (250 об/мин.). Полученные клетки собирали центрифугированием при 4000g. Дальнейшее выделение и очистку плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), позволяющего получить апирогенную ДНК. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле, измеряли ее концентрацию с помощью флуориметрии. Использовали также и иные способы очистки плазмид, в частности, хроматографию.

Определенные в эксперименте значения соответствовали значениям отношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} для чистых препаратов, для всех полученных препаратов плазмидной ДНК.

Также проводили количественное определение примесей белка в полученных препаратах плазмидных ДНК с помощью microBCA assay [Smith, P.K., et all, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* 150, 76-85 (1985)], измеряя оптическую плотность образующихся окрашенных белковых комплексов с медью и бицинхониновой кислотой при длине волны 562 нм. Чувствительность метода microBCA assay составляет 0.5-20 мкг/мл белка. Концентрация тотального белка ни в одном из исследуемых препаратов плазмидной ДНК не превышала норму.

Определяли и содержание бактериального липополисахарида в препаратах плазмидных ДНК, с использованием гель-тромб варианта ЛАЛ-теста, с чувствительностью >0,25 EU/мл (ToxinSensor, GenScript, США). ЛАЛ-реагентом служил лизат амебоцитов подковообразного краба *Limulus polyphemus*. ЛАЛ-реактив специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами, в результате ферментативной реакции происходит

изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина. Результаты оценивали по наличию или отсутствию плотного тромба на дне пробирки путем переворачивания пробирки. Гель-тромб не образовался при исследовании образца, разведенного в 10 раз, для препаратов всех полученных плазмидных ДНК, т.е. при чувствительности метода 2,5 EU/мл, что, учитывая концентрацию плазмидной ДНК в образце, говорит о допустимом показателе очистки от эндотоксинов.

Выход плазмидной ДНК составил от 3,5 мг до 5 мг из 1 л питательной среды. Процесс занял около 4 дней.

2.3. Получение вирусного вектора или вируса, кодирующего гибридный белок

2.3.1. Получение вектора на основе вируса

Синтезированные гены клонировали в векторе на основе аденоассоциированного вируса рAAVК-EF1 α -MCS (System Biosciences (SBI)). Создавали штамм-продуцент данного вектора, используя клетки *E.coli* (RecA⁻), например, DH10B/R или DH5 α , по аналогии с протоколом, описанным в примере 2.2.1.. В качестве продуцента также успешно использовали клетки бактерии *Bacillus subtilis*, а в качестве вектора – иные вирусные вектора.

Далее выделяли вектор для использования у млекопитающих, все по инструкции к вектору. Выход вектора составил от 2 мг до 3,2 мг из 1 л питательной среды.

2.3.2. Получение вируса

Для наработки вирусов использовали систему «AAV Helper-Free System». Это трех-плазмидная система, которая включает в себя (1) плазмиду рAAV-MCS, в которую клонировали гибридный ген, фланкированный повторами ITR; (2) плазмиду рAAV-RC, содержащую гер и сар гены, кодирующие белки репликации и белки вирусного капсида, причем повышение уровня экспрессии этих генов приводит к повышению вирусных титров; и (3) плазмиду рHelper, содержащую набор аденовирусных генов VA, E2A и E4, необходимых для достижения высоких титров ААВ в клетках. Аденовирусные протеины E2A и E1B, требуемые для продукции вируса, стабильно экспрессируются в ААВ-293 клетках, входящих в состав коммерческой системы и происходящих из клеток HEK293.

Синтезированные гены клонировали в векторе рAAV-MCS. Создавали штамм-продуцент данного вектора, используя клетки *E.coli* (RecA⁻), например, DH10B/R или DH5 α , по аналогии с протоколом, описанным в примере 2.2.1. В качестве продуцента также успешно использовали клетки бактерии *Bacillus subtilis*.

Далее выделяли вектор для получения вируса в клетках млекопитающих.

Клетки ААВ-293 выращивали на 10-этажных клеточных фабриках (Флаконы для культивирования клеток, 10-уровневые CellStack, с общей площадью 6360 см²

(CellSTACK® 10-STACK, США). Для наращивания клеток в количестве, достаточном для засева на 10-этажные фабрики, производили последовательно размораживание клеток, культивирование во флаконах T25 (EASY FLASK 25 V/C), затем во флаконах T75 (EASY FLASK 75 V/C), далее на 2-этажных клеточных фабриках площадью 1272 см² (Флаконы для культивирования клеток, двухуровневые CellSTACK 2-STACK, США). После окончания каждого этапа культивирования клетки снимали с подложки, подсчитывали их количества в аликвотах в камере Горяева, после чего определяли содержание живых клеток повторным подсчетом с красителем трипановым синим. Последовательно наращивали клетки для последующей наработки вирусов.

Клетки рассеивали на 4 10-этажные клеточные фабрики из расчета $6,3 \times 10^7$ клеток/фабрику. Через 24 часа после посева клеток и по достижении конfluenceности монослоя 60% была проведена трансфекция вектором с применением реагента «PEIpro reagent».

Среду роста меняли на бессывороточную среду DMEM, содержащую 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамина, за 2 часа до трансфекции. Для трансфекции клеток готовили смесь ДНК и «PEIpro» реагента в соотношении ДНК (мкг) и реагента (мл) как 1:1. Отбирали раствор вектора (например, pAAV-MCSseqidno4, но им не ограничиваясь), содержащий по 1 мг вектора, добавляли к нему растворы, содержащие паковочные плазмиды pAAV-RC plasmid и pHelper в количестве 1 мг каждой из плазмид. Объем конечного раствора доводили до 150 мл добавлением бессывороточной среды DMEM и тщательно перемешивали. В стерильный флакон вместимостью 250 мл переносили 3 мл реагента PEIpro, объем доводили до 150 мл добавлением бессывороточной среды DMEM, полученный раствор также перемешивали. Затем добавляли 150 мл раствора реагента PEIpro к 150 мл раствора вектора, незамедлительно тщательно перемешивали полученный раствор с помощью мешалки типа «вортекс», затем инкубировали раствор в течение 15 минут при комнатной температуре. После инкубации добавляли полученный раствор в культуральный флакон CF10 (10-этажная клеточная фабрика), в котором находились трансфецируемые клетки. Через 6 часов после трансфекции меняли среду на полную ростовую, содержащую среду роста DMEM, 4,5 г/л глюкозы, 10% ЭТС, 50 мкг/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. Инкубировали клетки при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 часов.

Вирусы, несущие нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO.:2-5, нарабатанные на AAV-293 клетках, выделяли методом замораживания-оттаивания. Для этого клетки промывали от клеточной среды, содержащей сыворотку, 500 мл раствора PBS. Клетки снимали с поверхности флакона добавлением 0,25% раствора трипсина-ЭДТА. Клетки повторно промывали от трипсина-ЭДТА добавлением раствора PBS, затем клетки

ресуспендировали в 25 мл раствора 150 мМ NaCl, 20 мМ Tris, pH=8,0 и подвергли 5 циклам замораживания при -80°C в низкотемпературном холодильнике и быстрого размораживания при +37°C на водяной бане. Затем инкубировали полученные лизаты клеток в течение часа при +37°C в присутствии 0,05 ед/мкл бензоназы нуклеазы для удаления молекул ДНК, которые в дальнейшем могут помешать специфичной очистке вирусов. Для удаления клеточного дебриса полученный раствор два раза центрифугировали при скорости 3000g, 15 мин, переносили надосадочную жидкость в чистые пробирки вместимостью 50 мл, после чего приступали к очистке вирусов.

Аденоассоциированные вирусы очищали с помощью аффинной хроматографии на 5-мл колонках «Hi-Trap Column». Перед нанесением на колонку лизат клеток, содержащий вирусные частицы, фильтровали через мембрану с размером пор 0,45 мкм, затем наносили на колонку. Элюцию проводили путем добавления 15 мл элюирующего раствора с pH2. Непосредственно после элюции значение pH в элюате доводили до нейтрального показателя с помощью добавления раствора 1М Трис-HCl, pH8,0.

Выход рекомбинантных вирусов составил до $17 \cdot 10^6$ активных вирусных частиц. Сравнимые результаты получали и с иными вирусами.

2.4. Получение короткой линейной конструкции, кодирующей гибридный белок по изобретению

Для наработки короткой линейной конструкции использовали полученную по п.2.2.2. плазмидную ДНК, либо вирусный вектор по п.2.3.1, либо амплифицированный с них фрагмент. С использованием специфичных праймеров и ПЦР, с использованием в качестве матрицы указанной в предыдущем предложении ДНК, амплифицировали фрагмент ДНК, содержащий промотор, лидерную последовательность мРНК, а также регуляторные последовательности для указанных элементов, полинуклеотид - гибридный ген, терминирующую последовательность. Амплификат может содержать и иные элементы, а указанные в предыдущем предложении элементы – ключевые.

Амплификацию указанной последовательности проводили в объеме 50 мкл, в тонкостенных полипропиленовых пробирках объемом 650 мкл, содержащих 5 мкл 10-кратного буфера Taq (700 мМ Трис-HCl, pH 8.6/ 25°C, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 5 мкл MgCl_2 (1.25 мМ), 1 мкл дНТФ, 31,5 мкл воды, 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров, 5 мкл ДНК-матрицы и 0,5 мкл полимеразы Taq (Fermentas, Литва).

Реакционную смесь прогревали 5 мин. при 95°C для денатурации ДНК. Для предотвращения испарения на реакцию смесь объемом 50 мкл наслаивали 30 мкл минерального масла Bayol F (Sigma, США). Реакцию амплификации проводили в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Проводили 35 циклов: 95°C – 20 сек,

50-62°C (в зависимости от праймеров) – 20 сек., 72°C – 1 мин. Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводили дополнительный цикл: 5 мин при 72°C.

Результат ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле. При положительном результате проводили препаративный электрофорез.

Аmplифицированные фрагменты ДНК концентрировали и очищали при помощи препаративного электрофореза в 0,8-1,2% агарозном геле (Gibco BRL, США). Пробу смеси после проведения ПЦР смешивали с шестикратным буфером (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин) (ThermoScientific, США) и наносили на гель, по 18 мкл в лунку. Электрофорез проводили в горизонтальном аппарате в буфере TAE (40 мМТрис-ацетат, 2 мМ ЭДТА рН 8,0, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при напряжении 5-10 В/см. Результат разделения ДНК регистрировали в проходящем УФ-свете (302 нм) трансиллюминатора Mastovue (LKB, Швеция). Длину амплифицированного фрагмента определяли по логарифмической зависимости подвижности ДНК от длины фрагментов в маркере. В качестве маркеров использовали фирменную смесь фрагментов ДНК "GeneRuler 1000 bp DNA Ladder"(Fermentas, Литва). Участок агарозы, содержащий полосу ДНК необходимого размера, вырезали, и фрагмент ДНК очищали с помощью набора DNA&Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Великобритания) в соответствии с инструкцией.

Современные методы очистки ДНК, в частности с использованием диоксида кремния, позволяют избавиться от всей примесей и получить пригодную для использования у животных и человека ДНК. Также возможно очищать амплификат и без использования препаративного электрофореза, с использованием иных методик – например, хроматографией, на колонке. Таким образом, готовый для использования препарат возможно получить уже через 2-3 часа.

Также получали и иные генетические конструкции по изобретению, в том числе содержащие и иные компоненты, вдобавок к указанным выше ключевым, а также иные варианты полинуклеотида по изобретению, чем представленного SEQ ID NO:2-5, с таких конструкций в клетках млекопитающих экспрессируется полинуклеотид по изобретению.

Выделенную генетическую конструкцию использовали у млекопитающих.

Пример 3. Демонстрация эффективности разработанных вакцин

3.1. Изготовление вакцинных кандидатов

Гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:1 и гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:6, получали с использованием методов генной инженерии, либо синтезировали химически.

Генетические конструкции получали как описано выше.

Гидроксид алюминия, в форме порошка, в количестве 37 мг добавляли к 5 мл раствора гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1 или 6, с концентрацией 400 мкг/мл, осуществлялось связывание с белком в течение 10 мин., после чего осуществляли дальнейшее разведение. В качестве жидкой среды использовали физиологический раствор. Всего каждое животное получало по 40 мкг гибридного белка и 100 мкг одной генетической конструкции, либо только 100 мкг одной генетической конструкции.

3.2. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов

Группы наблюдения (по 15 мышей в каждой группе):

- 1 - интактные,
- 2-21 вакцина на основе:
- 2 - плазмидной ДНК pсDNA3.1(+)*seqidno4*
- 3 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno4*
- 4 – вирусного вектора pAAVК-EF1 α -MCS*seqidno4*
- 5 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pсDNA3.1(+)*seqidno4*
- 6 – аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno4*
- 7 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno4* и гибридного белка SEQ ID NO.:1
- 8 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno4* и гибридного белка SEQ ID NO.:6
- 9 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pCMV-3Tag3-*aseqidno4*, и гибридного белка SEQ ID NO.:1
- 10 – вирусного вектора pAAVК-EF1 α -MCS*seqidno4* и гибридного белка SEQ ID NO.:6
- 11 - вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno4*, и гибридного белка SEQ ID NO.:1
- 12 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno2*
- 13 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno3*
- 14 - аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno5*
- 15 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pсDNA3.1(+)*seqidno3*
- 16 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno3* и гибридного белка SEQ ID NO.:1
- 17 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno5* и гибридного белка SEQ ID NO.:6
- 18 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pсDNA3.1(+)*seqidno2*, и гибридного белка SEQ ID NO.:1
- 19 - аденоассоциированного вируса pAAV-MCS*seqidno2* и гибридного белка SEQ ID NO.:6
- 20 - аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno4*, и/н введение
- 21 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pсDNA3.1(+)*seqidno3*, в/м введение + электропорация

Использовали дозировку 50 мкг ДНК (и в случаях комбинированной вакцины + 20 мкг гибридного белка) на мышь на одно введение, в объеме 100 мкл, разводили PBS.

Для иммунизации лабораторных животных использовали схему двукратного введения по дозе вакцинного кандидата внутримышечно, в квадрицепс левой конечности мыши, с интервалом в две недели. В группе 21 после введения осуществляли электропорацию. В группе 20 осуществляли интраназальное введение вируса.

Мыши выведены из опыта через 4 недели после последней иммунизации путем декапитации в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР (1985). В день окончания опыта отбирали селезенки в асептических условиях. Материал каждой группы объединяли – селезенки мышей одной группы помещали в питательную среду IMDM (Gibco) и гомогенизировали. Затем выделяли Т-лимфоциты.

Взвесь спленоцитов фильтровали через стерильную марлевую салфетку, переносили в 15 мл полипропиленовые пробирки ("Sarshtedt", Австрия) и ресуспендировали в 10 мл среды RPMI 1640 ("Биолот", Россия). Спленоциты осаждали центрифугированием на 1000 об/мин. (ускорение ~400 g) в течение 7 минут, супернатант сливали, и для удаления эритроцитов к осадку добавляли 1 мл FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Клетки ресуспендировали с помощью вортекса и инкубировали 2 минуты при комнатной температуре, затем в пробирку добавляли 10 мл среды RPMI 1640, и снова осаждали клетки центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 5 минут. Осадок спленоцитов отмывали единожды в 10 мл среды RPMI 1640, и клетки переводили на среду RPMI 1640 и 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку ("Биолот"). Концентрацию клеток определяли в камере Горяева, затем спленоциты переносили в 96-луночный круглодонный планшет ("SARSTEDT") в количестве 10^6 клеток на лунку.

Полученные лимфоциты окрашивали для идентификации. Содержимое каждой лунки планшета переносили в 5 мл пробирку ("Coulter", США), фосфатным буфером (pH7,4) доводили до объема 4 мл, клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, и добавляли в пробирку 2,5 мкл антител, меченных флуоресцентным красителем, с последующей двукратной отмывкой холодным PBS буфером. Использовали моноклональные антитела (Caltag Laboratories, США), конъюгированные с красителями против клеточных антигенов: APC (Molecular Probes, США) для индикации живых клеток, Alexa Fluor 700 (Molecular Probes, США) для индикации лимфоцитов, FITC (ThermoFisher Scientific, США) для индикации CD4+ Т-лимфоцитов, PE-PC5.5 (Abcam, США) для индикации CD8+ Т-лимфоцитов, PE (Abcam, США) для индикации Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон гамма, TNF α . Исходная

концентрация антител во всех экспериментах - 100 мкг/мл. Конъюгацию проводили по инструкции производителя красителя.

Далее проводили стимуляцию полученных лимфоцитов пептидом DYSVLYNSASFSTFKCY в концентрации 40 мкг/мкл, либо стафилококковым энтеротоксином В (SEB), данную пробу считали положительным контролем, либо вносили среду RPMI, и данную пробу считали отрицательным контролем. Пептид представляет собой фрагмент белка S нового коронавируса, использованного в гибридном белке, как закодированном в анализируемой ДНК, так и использованном в комбинированных вакцинных кандидатах. Полученные лимфоциты анализировали на проточном цитометре Gallios Navios (Beckman Coulter).

Анализировали уровни экспрессии молекул субпопуляции Т-клеток: CD3, CD4, CD8, а также интерферона гамма (IFN γ) и фактора некроза опухоли (TNF α). Гейт (окно) популяции устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. Сбор данных производили с использованием программы System II Software (Beckman Coulter). В каждом эксперименте проводили анализ не менее 50 тысяч клеток. Интерферон способствует усилению презентации через МНС 1 класса, что положительно сказывается на борьбе с патогеном.

При стимуляции пептидом во всех группах, кроме группы интактных животных, наблюдали увеличение относительного содержания CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. В ряде групп увеличивалось количество CD4 Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , а также продуцирующих и IFN γ , и TNF α . При этом в большинстве групп наблюдали увеличение количества CD8 Т-лимфоцитов, продуцирующих оба цитокина, в нескольких группах – продуцирующих только IFN γ . Что интересно, количество CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, продуцирующих TNF α , увеличилось во всех группах.

Различия между группами наблюдали в соотношении CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, в том числе продуцирующих цитокины, и в количестве. В группах комбинированных вакцин, где использован также гибридный белок, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1 или SEQ ID NO.:6, количество CD4 Т-лимфоцитов больше преваляло над количеством и CD8 Т-лимфоцитов, чем в группах вакцин на основе ДНК. При этом в группах вакцин на основе ДНК количество CD8 Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , в общей массе после стимуляции было меньше, чем количество таких CD4 Т-лимфоцитов.

Наибольший прирост количества Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , выявлен при исследовании групп на основе плазмидных и линейных ДНК.

При стимуляции пептидом превалирование Т-хелперов увеличилось в группе интактных животных. В группах же животных, иммунизированных генетическими конструкциями, при стимуляции пептидом превалирование Т-хелперов становилось меньше, чем при отсутствии стимуляции.

Это может говорить о том, что после двукратной иммунизации разработанной генетической конструкцией, при экспозиции белков нового коронавируса Т-лимфоцитам в иммунизированном организме будет индуцирован профиль иммунного ответа, в котором цитотоксический ответ будет проявлен сильнее, чем при иммунизации совместно с белком, либо полноценной вирусной частицей коронавируса, либо ее белковыми фрагментами. Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют соответственно и терапевтический потенциал разработанных вакцин, в особенности на основе плазмидной ДНК и линейных конструкций.

Также полученные результаты демонстрируют, что Т-лимфоциты узнают ранее встречавшийся фрагмент коронавирусного белка в составе гибридного белка, синтезированного с введенной ДНК (и в части вариантов вакцин также имеющегося в вакцине). Такие результаты говорят об узнаваемости Т-лимфоцитами доменов гибридного белка, в том числе синтезируемого в организме с генетической конструкции, а также о специфичности формируемого иммунного ответа.

Электропорация не усиливала ответ, и, вероятно, целесообразно использовать меньшие дозы генетической конструкции при таком введении.

При оценке результатов также важно учитывать следующее.

CD4 – маркер, присутствующий и на Т-лимфоцитах, и на клетках моноцитарного ряда. CD8 – маркер, присутствующий и на Т-лимфоцитах, и на НКТ-клетках. НКТ-клетки несут и маркер CD3, они относятся к Т-клеткам, а также имеют спонтанные цитотоксические функции, похожие на таковые НК-клеток. НКТ-клетки также выделяют цитокины, под действием которых В-лимфоциты могут трансформироваться в макрофаги.

Как известно, CD4⁺ Т-лимфоциты представлены Th1 и Th2. Во многих наблюдениях показана роль определенных факторов в детерминировании «переключения» иммунного ответа в сторону Th1 или Th2. Одними из факторов являются качество и доза антигена.

CD4⁺Т-лимфоциты, детерминированные по пути развития Th2, осуществляют взаимодействие с В-лимфоцитами, что вызывает снижение активности цитотоксических лимфоцитов. Th2 не вырабатывают интерферон гамма.

CD4⁺Т-лимфоциты, детерминированные по пути развития Th1, также осуществляют взаимодействие с В-лимфоцитами. Однако в данном случае не наблюдается ингибирование активности CD8⁺Т-лимфоцитов. В такой ситуации возможно одновременное увеличение

цитотоксического и гуморального ответов на иммуноген. Th1 вырабатывают интерферон гамма.

Полученные результаты позволяют предположить, что разработанные варианты вакцины на основе ДНК, а также с добавлением гибридного белка, вызывают формирование в немалой степени выраженного цитотоксического иммунного ответа, и при встрече с фрагментом патогена позволяет такой ответ усилить, что делает крайне привлекательным их использование в качестве действующего вещества противокоронавирусной вакцины. Поскольку, особенно в условиях сложности тестирования на коронавирус, сложно оценить, заражен ли человек, то явным преимуществом предлагаемой вакцины является индукция такого профиля иммунного ответа.

Кроме того, нужно учитывать, что TNF α важен для устойчивости не только к инфекциям, но и к раку [Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1;50(3):184-95, а также множество иных статей], а также то, что количество CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, продуцирующих TNF α , увеличивалось во всех группах вакцинированных животных. Для IFN γ также известно противоопухолевое действие [Шмелев В.А. Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1-противоинфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. Медпрактика-М. Москва, 2008], и количество Т-клеток, его продуцирующих, также возрастало.

Таким образом, можно сделать вывод о противоопухолевой активности разработанных конструкций, опосредованной биологической функцией, главным образом, фактора некроза опухоли – TNF α , а также интерферона-гамма.

3.3. Индукция синтеза специфичных антител

Иммунизацию кроликов, возраст 9 месяцев, проводили подготовленными и описанными выше вакцинными кандидатами. Вводили генетическую конструкцию в количестве 250 мкг, концентрация 123 мкг/мл, в объеме 2 мл. Либо вводили комбинированный препарат, ДНК с гибридным белком, ДНК в количестве 100 мкг, гибридный белок в количестве 100 мкг, в объеме 2 мл, с полным адьювантом Фрейнда, адьювант – 1/10 от объема раствора для иммунизации.

Иммунизацию проводили двукратно, с интервалом в две недели, подкожно в бедро, через две недели после второй иммунизации осуществляли забор крови из ушной вены.

Осуществляли забор цельной крови у всех исследуемых животных в объеме 200-300 мкл из ретроорбитального синуса. Кровь инкубировали в термостате при 37°C в течение 30

мин, после чего осуществляли центрифугирование в течение 10 мин при 2000 g. Отбирали сыворотки, не задевая пробка, в отдельную пробирку. Для избегания гемолиза сыворотки получали не позже, чем через 2 ч после отбора крови. Для хранения пробирки замораживали и оставлялись при температуре минус 20 °С.

Измеряли титры антител в сыворотке крови исследованных животных. Титр антител сывороток иммунизированных животных определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты анализировали с использованием программы Microsoft Excel.

Выявлено, что все вакцинные кандидаты вызывали формирование высокого титра антител. Титр антител при введении вакцин, описанных под номерами 2-21 в примере 3.2., был от 1:16 000 до 1:64 000, что является достаточно высоким показателем. При введении вакцины на основе генетической конструкции электропорацией титры антител были выше в группе с линейной конструкцией.

Также продемонстрирована безопасность предлагаемых иммуногенов: животные всех групп выжили, в процессе испытаний побочные эффекты не наблюдали.

3.4. Исследование способности синтезируемого гибридного белка связываться с антителами к коронавирусу у людей

Клетки HEK293 культивировали при 37⁰С в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, влажность 100%) в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, без антибиотиков, с L-глутамином. Трансфекцию методом кальциевой трансфекции проводили при 70% конfluenceности монослоя. Использовали 2 мкг плазмиды pVAXseqidno4/5 или линейной конструкции, амплифицированной с нее, кодирующей гибридный белок SEQ ID NO.:1, в объеме 5 мл культуральной среды. Через 24 часа после трансфекции заменяли среду на свежую и культивировали клетки в течение 5 суток.

Культуральную среду собирали и освобождали от мертвых и отслоившихся с подложки клеток центрифугированием при 1000g в течение 10 минут. Белки надосадка разделяли электрофоретически (20 мкл на дорожку) в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, а затем переносили (полусухим электропереносом) на нитроцеллюлозную мембрану для последующего Вестерн-блот анализа. Мембрану нарезали на фрагменты, соответствующие дорожкам, и каждый фрагмент блокировали с помощью 3%-ного раствора обезжиренного молока, приготовленного на PBS с добавлением Tween-20, в течение 30 минут. Затем фрагменты мембраны независимо инкубировали при +4⁰С в течение 16 ч с сыворотками, полученными от здоровых людей и больных с разным уровнем анти-SARS-CoV-2 антител, подтвержденными коммерческими тестами.

После инкубации и отмывки от сывороток, мембраны инкубировали с коммерческими антителами против человеческих IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена, и выявляли места связывания по хроматографической реакции пероксидазы с 1-хлор-нафтолом.

При инкубации мембран с сыворотками пациентов, позитивных на антитела против Covid-19, проявлялись две полосы разной степени интенсивности, соответствующие молекулярным весам мономера и димера рекомбинантного белка, такие же полосы идентифицированы при инкубации с сыворотками иммунизированных генетической конструкцией по изобретению (и + рекомбинантным белком) кроликов. Сыворотки от здоровых людей не открывали полосы на мембране, демонстрируя отсутствие неспецифического связывания с рекомбинантным белком.

Таким образом, продемонстрирована индукция специфичного иммунного ответа при использовании вакцин на основе заявляемых генетических конструкций - линейной конструкции, вирусного вектора, плазмидной ДНК, вируса, - при использовании полинуклеотидов по изобретению, в том числе и с фрагментом, кодирующим секреторную последовательность, и без него, а также на основе вакцин, дополнительно содержащих гибридный белок, и при режимах введения как стандартном, так и с использованием электропорации, и при интраназальном введении вируса.

Также выявлена способность разработанных вакцин к индукции Т-клеток, синтезирующих противовирусные и противоопухолевые цитокины.

Для индукции длительного ответа, связанного с реакцией герминативных центров, у человека интервал между первичной и вторичной иммунизациями целесообразно делать не менее, чем 1-2 месяца, оптимально – не менее 4-6 месяцев, для оптимального созревания аффинности В-клеток. При сокращении интервала бустерный ответ может быть меньше. Однако в текущей ситуации, учитывая полученные результаты опытов, можно проводить вторичную иммунизацию спустя 2-3 недели после первой иммунизации.

Проведены также иные исследования, в том числе с использованием иных количеств генетической конструкции (и гибридного белка), демонстрирующие эффективность разработанной вакцины, всех вариантов, для профилактики и терапии нового коронавируса. Исследование в терапевтической модели также успешно проведено. Все исследованные варианты вакцин индуцировали спад инфекции, легкое течение и скорое выздоровление, отсутствие побочных эффектов.

Также продемонстрирована безопасность предлагаемой вакцины: животные всех групп кандидатных вакцин выжили (и были выведены из эксперимента принудительно - мыши), в процессе испытаний побочные эффекты не наблюдали.

Вакцина для профилактики и лечения коронавирусной инфекции

Формула

1. Гибридный белок, включающий фрагменты белков М, S, N, Е коронавируса, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1.
2. Полинуклеотид, кодирующий гибридный белок по п.1.
3. Полинуклеотид по п.2, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO.:2
4. Полинуклеотид по п.2, отличающийся тем, что также содержит фрагмент, кодирующий гетерологичную секреторную последовательность.
5. Полинуклеотид по п.4, отличающийся тем, что гетерологичная секреторная последовательность выбрана из таковой ТРА, ЕРО, ГРЧ или ИГФ.
6. Полинуклеотид по п.5, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO.:3-5.
7. Генетическая конструкция, включающая полинуклеотид по любому из пп.2-6 и элементы, позволяющие осуществить его экспрессию в клетках целевого организма.
8. Генетическая конструкция по п.7, отличающаяся тем, что представлена рекомбинантным вектором для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, содержащим прокариотические ориджин репликации и маркерный ген, эукариотические сильный промотор и лидерную последовательность мРНК, а также регуляторные последовательности для указанных элементов, от одного сайта для клонирования гена интереса и от одного сайта для посадки от одного праймера для анализа состава рекомбинантного вектора, полинуклеотид по любому из пп.2-6 и терминирующую последовательность.
9. Генетическая конструкция по п.8, отличающаяся тем, что представлена плазмидной ДНК из рсDNA3.1(+), рVAX1, рCMV-3Tag3-a, в плазмидной ДНК клонирован полинуклеотид по любому из пп.2-6.
10. Генетическая конструкция по п.7, отличающаяся тем, что представлена линейным фрагментом ДНК, содержащим промотор, лидерную последовательность мРНК, регуляторные последовательности для указанных элементов, полинуклеотид по любому из пп.2-6, терминирующую последовательность.

11. Генетическая конструкция по п.7 или 8, отличающаяся тем, что представлена вектором на основе вируса, в векторе клонирован полинуклеотид по любому из пп.2-6.

12. Генетическая конструкция по п.11, отличающаяся тем, что представлена аденоассоциированным вирусом, в котором клонирован полинуклеотид по любому из пп. 2-6.

13. Прокариотическая рекомбинантная клетка, содержащая генетическую конструкцию по любому из пп.7-9,11,12, для получения такой генетической конструкции.

14. Прокариотическая рекомбинантная клетка по п.13, представленная штаммом бактерий *Escherichia coli* DH5a, содержащим вектор из pcDNA3.1(+), pVAX1, pCMV-3Tag3-a, который содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO.:2-5.

15. Вакцина для профилактики и лечения коронавирусной инфекции у человека или животного, содержащая генетическую конструкцию по любому из пп. 7-12 в качестве активного агента, в эффективном количестве, а также физиологически приемлемый носитель и буферный раствор.

16. Вакцина по п.15, отличающаяся тем, что дополнительно содержит гибридный белок по п.1 или включающий фрагменты белков M, S, N, E коронавируса, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:6.

17. Вакцина по п.15 или 16, где генетическая конструкция представлена вектором из pcDNA3.1(+), pVAX1, pCMV-3Tag3-a, который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO.:4.

18. Способ получения вакцины для профилактики и лечения коронавирусной инфекции, заключающийся в том, что амплифицируют генетическую конструкцию по п.10 с использованием ПЦР, очищают и смешивают с физиологически приемлемым носителем и буферным раствором.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:
202092658

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 14/165(2006.01) *A61K 39/215(2006.01)*
C07K 19/00(2006.01) *A61P 31/14(2006.01)*
C12N 15/50 (2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/165, C07K 19/00, C12N 15/50, C12N 15/86, C12N 5/10, A61K 39/215, A61K 39/295, A61P 31/14, A61P 37/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
 DB WIPO (Patentscope), DB Espacenet, PatFT & AppFT USPTO, EAPATIS, RUPAT, CIPO, J-PlatPat, KIPRIS, K-PION, SIPO; PubMed Central, EMBASE, РИНЦ (e-Library); NCBI Blast (blastpa: nr, pat), EBI Fasta (uniprot, patent)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	CN 111393532 A (BEIJING DIAGREAT BIO TECH CO LTD), 10.07.2020 <i>формула, абз.0027-0031, SEQ ID NO: 12, 14, Табл.2, Пример 2</i>	1-18
Y	RU 2383621 C2 (Ди-Эн-Эй ШАТТЛ БАЙОФАРМ КО., ЛТД.), 10.03.2010 <i>SEQ ID NO: 1, стр.6 описания</i>	1-18
Y	US 2020/325182 A1 (KELLER LORRAINE, PADIDAM MALLA), 15.10.2020 <i>SEQ ID NO: 16, Пример 9, абз.0378, 1528-1536</i>	1-18
Y	BUCHHOLZ U.J. et al. "Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity." <i>Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(26): 9804-9809</i> <i>весь документ</i>	1-18

последующие документы указаны в продолжении

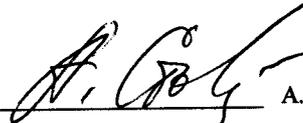
* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
 «D» - документ, приведенный в евразийской заявке
 «E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
 «O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
 "P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
 «X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
 «Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
 «&» - документ, являющийся патентом-аналогом
 «L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **02/04/2021**

Уполномоченное лицо:
 Заместитель начальника Управления экспертизы
 Начальник отдела химии и медицины


 А.В. Чебан

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202092658

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ROTWEIN P. et al., "Biosynthesis of human insulin-like growth factor I (IGF-I). The primary translation product of IGF-I mRNA contains an unusual 48-amino acid signal peptide." Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(24): 11807-11812 <i>фиг.1</i>	6, 14, 17
A	WO 2006/009011 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE), 26.01.2006 <i>реферат, формула</i>	1-18
A	CN 111217920 A (HEBEI JINGSHUO BIOTECHNOLOGY CO LTD), 02.06.2020 <i>реферат, формула</i>	1-18