

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190992** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.30

(22) Дата подачи заявки
2021.05.08

(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)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

(96) 2021000047 (RU) 2021.05.08
(71) Заявитель:
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; АЛЕКСЕЕВ
АЛЕКСЕЙ ВИКТОРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:
**Духовлинов Илья Владимирович,
Колмаков Николай Николаевич,
Чирак Евгений Леонидович,
Федорова Екатерина Алексеевна,
Копать Владимир Владиславович,
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 фармацевтическая композиция - вакцина и, соответственно, фармацевтическая субстанция на основе генетической конструкции, кодирующей гибридный белок, включающий фрагмент белка человека FLT3LG и фрагменты белков М, S, N, Е, nsр-2, nsр-3 нового коронавируса, а также в одном из вариантов дополнительно содержащая такой или похожий 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 и используемого 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. Также предложен набор для вакцинации и способ индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2. Предложенные объекты позволяют использовать минимальные количества ДНК - от 25 мкг в 1 дозе - для получения результата - профилактики и терапии нового коронавируса.

A1

202190992

202190992

A1

Вакцина для профилактики и лечения коронавирусной инфекции

Описание

Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для осуществления профилактики или 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 уже 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 30 октября 2020 г. в мире зарегистрировано в общей сложности уже порядка 45 миллионов случаев заболевания COVID-19 и 1,2 млн смертей. Большая часть случаев и смертей – в США (9 млн и 230 тыс., соответственно), Индии (8 млн и 120 тыс., соответственно), Бразилии (5,5 млн и 158 тыс., соответственно). На 10 апреля 2021 г. в мире зарегистрировано в общей сложности уже порядка 135,5 миллионов случаев заболевания COVID-19 и 2,9 млн смертей. Случаи коронавируса и смерти от него зафиксированы уже в 219 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/>], а в 2015 году число умерших от известного инфекционного заболевания было максимум 1,4

млн (туберкулез), то число погибших от нового коронавируса значительно выше и превышает число умерших от любого известного инфекционного заболевания и даже двух-трех [<https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/v-4-17162-world-health-statistics-2017.pdf>].

Инфицирование коронавирусом SARS-CoV-2 приводит к развитию респираторной вирусной инфекции. У большинства пациентов с COVID-19 имеются слабые клинические проявления или симптомы средней тяжести, но у примерно 15% больных развивается тяжелая пневмония, а у около 5% - острый респираторный дистресс синдром (РДС) и полиорганная недостаточность. Смертность при COVID-19 колеблется от 1 до 5%, наиболее тяжелые формы развиваются у пациентов с сопутствующими коморбидными состояниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания, диабет, хронические заболевания почек, печени и др. [Chen e.a., 2020 (c); Huang e.a., 2020; Xu e.a., 2020]. Также у большинства переболевших наблюдаются проблемы со здоровьем, не проходящие месяцами.

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, узнать эффективность и безопасность выводимых на рынок вакцин в перспективе удастся только в будущем. Так, уже выявлены побочные действия, вплоть до смертельного исхода, у вакцины на основе аденовируса, кодирующего полноразмерный S-белок коронавируса, производимой компанией AstraZeneca и которую уже получило огромное количество людей.

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 данный момент зарегистрировано в WHO ICTRP более 3937 рандомизированных и неслучайных исследований (<https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform>). 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)].

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, nsр-2, nsр-3 нового коронавируса, а также белка FLT3LG. 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 специфичных 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. Также известно, что коронавирус содержит и ряд фрагментов в других белках, сходных с белками организма. Соответственно, использование вакцин, содержащих такие фрагменты, т.е. вакцин на основе ослабленного или убитого нового коронавируса, рекомбинантных вакцин, содержащих такие фрагменты, например, 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. Все фрагменты белков коронавируса, использованные нами для создания данной вакцины, не несут сходство с фрагментами белков организма, что обеспечивает безопасность не только первичную, но и отложенное отсутствие побочных эффектов, связанных с вакцинацией.

В состав гибридного белка введены фрагменты неструктурных белков 2 и 3 вируса SARS-CoV-2 (nsp-2, nsp-3) из рамки считывания *orf1ab*. По последним литературным данным, мутации в белке nsp-2 обеспечивают высокую патогенность коронавируса, а мутации в белке nsp-3 отличают этот вирус от других коронавирусов.

В составе гибридного белка также присутствует фрагмент белка Flt3Lg. FLT3LG, или лиганд *fms*-подобной тирозинкиназы 3 (англ. *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) — белок, цитокин, продукт гена человека *flt3lg*. FLT3LG стимулирует пролиферацию предшественников гемопоэтических клеток за счет активации своего рецептора FLT3. Действует в синергии с другими колоние-стимулирующими факторами и интерлейкинами. Является основным фактором роста для дендритных клеток и селективным индуктором дендритных клеток, усиливает нацеливание антигена на дендритные клетки, улучшает презентацию антигена.

Описанные преимущества являются техническим результатом использования разработанного белка для создания вакцины.

Нами предложена фармацевтическая композиция на основе генетической конструкции - вакцина для профилактики и лечения коронавируса у человека или животного, а также фармацевтическая субстанция, которые содержат генетическую конструкцию в качестве активного агента, в эффективном количестве. Генетическая конструкция кодирует описанный выше гибридный белок. Фармацевтическую субстанцию используют для получения вакцины.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая дополнительно описанный выше гибридный белок или гибридный белок, также содержащий фрагменты антигенов коронавируса – белков M, S, N, E нового коронавируса, короче описанного выше гибридного белка. Такая композиция представляет собой вакцину для профилактики и лечения коронавируса у человека или животного и фармацевтическую субстанцию.

Аналоги предлагаемой нами фармацевтической композиции - вакцины и соответственно субстанции 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 - фармацевтической композиции - 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, а при ослаблении мер при отсутствии устранения угрозы значительно уменьшится количество работоспособного населения. Только быстрая вакцинация и эффективная вакцинация в кратчайшие сроки сможет позволить снять ограничительные меры, предотвратить снижение работоспособности и количества работоспособного населения и не дать экономике прийти в сильный упадок.

Технический результат от использования фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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), а также наличием фрагментов белков nsp-2, nsp-3.

Технический результат от использования фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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 быстрый 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 фармацевтической композиции – вакцины. Он достигается 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].

Также он достигается благодаря кодированию в генетической конструкции и/или наличию в белке, лежащих в основе вакцины, фрагмента белка FLT3LG, который нацелен на работу в дендритных клетках, которые являются одним из ключевых элементов противовирусного иммунного ответа.

Технический результат от использования фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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. Возможно

будет также увидеть и по тесту на клеточный иммунный ответ, болел ли человек, либо был вакцинирован, благодаря использованию для стимуляции антигенов, повторяющих, либо не повторяющих фрагменты коронавируса белков вакцины.

Технический результат от использования фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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 фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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. Также он достигается тем, что у вакцинируемого будет вырабатываться стойкий иммунитет к факторам вирулентности nCoV-19, благодаря тому, что в основе вакцины в составе гибридного белка, закодированного на ДНК или используемого в совокупности с ДНК, использованы белки nsp-2 и nsp-3 из рамки считывания *orf1ab* нового коронавируса.

Технический результат от использования фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - 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 фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции, 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 фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции - по изобретению, содержащей плазмидную ДНК, заключается также в противоопухолевом эффекте за счет наличия в структуре

используемой генетической конструкции СrG-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 фармацевтических субстанций, 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, фармацевтическую субстанцию 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 фармацевтическая композиция – вакцина и соответственно субстанция – на данный момент удовлетворяет данному требованию, помимо высокой безопасности.

Нами предложен способ получения фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции – по изобретению, заключающийся в том, что амплифицируют генетическую конструкцию – линейный фрагмент ДНК – с использованием ПЦР, очищают и разбавляют водой для инъекций или буферным раствором. Могут смешивать с физиологически приемлемым носителем.

Технический результат от использования способа – 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, либо фармацевтической субстанции невозможно получить в такие краткие сроки.

Технический результат также заключается в простоте получения фармацевтической композиции – вакцины и соответственно субстанции. Он достигается тем, что для производства такой композиции 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 фармацевтической композиции – субстанции и соответственно 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 коронавирусных антигенов в организме, а также субстанций для производства вакцин.

Предложен полинуклеотид, кодирующий разработанный гибридный белок, включающий фрагменты белков M, S, N, E, nsр-2, nsр-3 нового коронавируса, а также белка FLT3LG, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1. Полинуклеотид может также содержать фрагмент, кодирующий нативную для FLT3LG или гетерологичную секреторную последовательность.

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

Технический результат от использования предлагаемого нами полинуклеотида, также содержащего нативную, либо гетерологичную секреторную последовательность, также заключается в индукции иммунного ответа, сдвинутого чуть более в сторону гуморального иммунного ответа, чем при отсутствии секреторной последовательности.

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

Предложена рекомбинантная клетка, содержащая генетическую конструкцию по изобретению. Это прокариотический продуцент генетической конструкции, либо гибридного белка для фармацевтической композиции – субстанции и соответственно вакцины. Либо это эукариотический продуцент гибридного белка для фармацевтической композиции – субстанции и соответственно вакцины.

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

Технический результат от использования продуцента разработанного гибридного белка - в получении разработанного белка для использования в производстве фармацевтической субстанции и соответственно вакцины.

Также предложен набор для вакцинации, содержащий описанную выше фармацевтическую композицию на основе генетической конструкции и раствор на основе поли этиленимина (ПЭИ). Такой набор может содержать дополнительно средство для их смешивания.

Технический результат от использования набора – в значительном уменьшении количества используемой генетической конструкции для достижения эффекта.

Также технический результат заключается в увеличении эффективности интраназальной иммунизации от коронавируса.

В процессе исследований наблюдали важный неожиданный технический результат – высокую эффективность при совершенном отсутствии каких-либо побочных эффектов или даже неприятных ощущений. Важно и то, что фармацевтическая композиция хранится при +4°C длительное время без потери свойств.

Предложен и способ индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2, заключающийся в парентеральном или интраназальном введении фармацевтической композиции по изобретению, в части вариантов - том числе после смешивания с ПЭИ. В одном из вариантов, при парентеральном введении фармацевтической композиции без смешивания с ПЭИ дополнительно осуществляют электропорацию.

Технический результат заключается в удобстве иммунизации против коронавируса за счет интраназального введения вакцины, что достигается используемой фармацевтической композицией, в части вариантов – в совокупности с ПЭИ.

Технический результат заключается также в увеличении потенциального количества получателей вакцин, за счет уменьшения количества действующего вещества при сохранении эффективности и безопасности. Он достигается используемой фармацевтической композицией, главным образом, благодаря смешиванию с раствором ПЭИ, либо без смешивания, но с использованием электропорации.

Также технический результат – в увеличении количества способов индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2.

Гибридный белок, полинуклеотид, генетическая конструкция, рекомбинантная клетка, способ получения вакцины, фармацевтическая композиция, представленная фармацевтической субстанцией, – все эти объекты используют для получения вакцины по изобретению для использования в способе по изобретению.

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

Подробное описание изобретения.

Предложена группа изобретений: гибридный белок, полинуклеотид, в том числе содержащий фрагмент, кодирующий секреторную последовательность, генетическая конструкция, рекомбинантная клетка, фармацевтическая композиция на основе

генетической конструкции, которая также может содержать гибридный белок, способ ее получения, набор для вакцинации, способ индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2.

Разработан гибридный белок, который включает иммуногенные фрагменты белков М, S, N, E, nsр-2, nsр-3 нового коронавируса, а также белка FLT3LG, 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 encorbio.com/protocols/Codon.htm или molbiol.ru или иных ресурсах.

Полинуклеотид может не содержать секреторную последовательность, например, может быть представлен нуклеотидами подряд 1-12, 73-2166 SEQ ID NO.:4. Полинуклеотид может содержать нативную (например, SEQ ID NO.:3) или гетерологичную (например, из SEQ ID NO.:4-9) секреторную последовательность, оптимизированную по кодонному составу для целевого организма – например, таковую TPA (tissue-type plasminogen activator), ГРЧ (гормон роста человека), IGF (insulin-like growth factor - инсулиноподобный фактор роста), EPO (erythropoietin - 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 адьювантным 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-продуцента. 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 антибиотикам, 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 используется 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.

- инсультатор, 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 инсультатора 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 EMEA (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 – человеке или животном, 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 фармацевтической композиции – фармацевтической субстанции и соответственно 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 разбавлении водой для инъекций или буферным раствором. Можно смешивать с физиологически приемлемым носителем. Такой способ получения композиции является самым быстрым, и ни одна зарегистрированная в России вакцина не нарабатывается таким способом. Однако в условиях такой стремительно распространяющейся инфекции, как новая коронавирусная инфекция, охватившая мир, только такой способ наработки фармацевтической субстанции и соответственно вакцины отвечает брошенному природой вызову.

Фармацевтическую композицию – субстанцию и соответственно 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.

Фармацевтическую композицию – субстанцию и соответственно 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.

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

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

Вакцины и соответственно субстанции 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 рекомбинантная клетка, содержащая предложенную генетическую конструкцию.

Прокариотический продуцент представлен, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. В одном из вариантов это штамм бактерий *Escherichia coli* DH5a или DH10B/R, содержащий вектор pcDNA3.1(+), pVAX1 или pCMV-3Tag3-a, который содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO.:3-9. Либо вектор pAAVK-EF1 α -MCS. В одном из вариантов это штамм бактерий *Escherichia coli* BL21 (DE3), содержащий вектор для экспрессии гибридного белка по изобретению в данном штамме, например, pET24a, но ими не ограничиваясь, соответственно полинуклеотид оптимизирован по кодонному составу для экспрессии в клетках прокариот. Преимущественно в таком случае гибридный белок накапливают в виде телец включения с последующей солубилизацией и очисткой, однако возможно и получение из периплазматического пространства и секретируемого белка. Белок возможно получить и с помощью бесклеточной системы наработки белка, а также с помощью химического синтеза.

Эукариотический продуцент гибридного белка по изобретению может быть любым эукариотическим организмом, кроме человека, либо клеткой эукариотического организма. Кодонная оптимизация полинуклеотида осуществляется для экспрессии в данном продуценте. Это могут быть клетки CHO, дрожжи, грибы и др.

Предложена фармацевтическая композиция на основе генетической конструкции - вакцина для профилактики и лечения коронавируса, а также фармацевтическая субстанция, которые содержат генетическую конструкцию в качестве активного агента, в эффективном количестве. В одном из вариантов композиция также содержит гибридный белок, включающий фрагменты белков M, S, N, E, nsр-2, nsр-3 коронавируса, FLT3LG – человека, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный SEQ ID NO.:1, либо включающий фрагменты белков M, S, N, E коронавируса, соединенные гибкими мостиками, охарактеризованный SEQ ID NO.:10. Композиция может содержать или не содержать фармацевтически приемлемые носители и/или буферные растворы, которые известны из уровня техники и включают те, которые описаны в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Могут содержаться и консерванты, например, бензиловый спирт, но им не ограничиваясь. В качестве потребителя вакцины может выступать как человек, так и животное, в том числе из домашних или сельскохозяйственных животных.

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, секретируется во внеклеточное пространство, и реализуется механизм гуморального иммунного ответа.

Авторы предлагают способ индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2, включающий парентеральное, либо интраназальное введение вакцины, всех вариантов. Возможны и иные типы введения. Генетическая конструкция содержится в композиции предпочтительно в концентрации 0,2 - 1 мг/мл.

Также вакцину по изобретению можно вводить парентерально с использованием электропорации, для увеличения эффективности доставки в клетки для экспрессии полинуклеотида. При таком введении генетическая конструкция содержится в композиции предпочтительно в концентрации 0,1 – 0,2 мг/мл.

Также предложен набор для вакцинации, содержащий фармацевтическую композицию по изобретению и раствор на основе ПЭИ. Такой набор может содержать

дополнительно средство для их смешивания. Благодаря использованию ПЭИ возможно применение минимального количества генетической конструкции в способе индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2. Также выявили неожиданно крайне высокую эффективность вакцины при интраназальном введении, при использовании совершенно минимальных количеств генетической конструкции.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованного изобретения. Полученные результаты исследований проиллюстрированы примерами (1-4).

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 696 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 75,8 кДа, pI 9,67, период полужизни в млекопитающих около 4,4 часов. С метионином на N-конце – 75,9 кДа, pI 9,67, период полужизни в млекопитающих около 30 часов. При добавлении секреторной последовательности Flt3l (SEQ ID NO:2) с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 774 а.о., молекулярная масса 84,4 кДа, pI 9,42. При добавлении секреторной последовательности IGF (GKISSLPQTQLFKCCFCDFLK), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 717 а.о., молекулярная масса 78,2 кДа, pI 9,62. При добавлении секреторной последовательности ГРЧ (ATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 722 а.о., молекулярная масса 78,5 кДа, pI 9,64. При добавлении секреторной последовательности TPA (MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS), гибридный белок состоит из 719 а.о., молекулярная масса 78,2 кДа, pI 9,61. При добавлении секреторной последовательности EPO (GVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 723 а.о., молекулярная масса 78,7 кДа, pI 9,61. При добавлении консенсусной секреторной последовательности

(LLLLLLLLLLLLALALA), с метионином на N-конце гибридный белок состоит из 712 а.о., молекулярная масса 77,5 кДа, pI 9,67.

При использовании иных секреторных сигналов показатели немного изменяются.

Смоделированный гибридный белок в одном варианте состоит из 424 а.о., с метионином на N-конце – 425 а.о., представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10. 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.

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. При использовании в фармацевтической композиции гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO:10, полученного в клетках прокариот, он может быть обработан для удаления формилметионина.

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-кодоном для инициации трансляции, после старт кодона – в части вариантов - сигнальной последовательности, например, нативной для Flt3l, либо гетерологичной - ТРА, ГРЧ, IGF, ЕРО, либо консенсусной - представленной а.о. MLLLLLLLLLLLLALALA, для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки, с одновременной оптимизацией по кодонному составу для экспрессии в клетках человека, использован инструмент на сайте molbiol.ru и encorbio. Получили, например, последовательность, охарактеризованную SEQ ID NO:5-7 и SEQ ID NO:8,9, соответственно.

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:3,4.

Рассчитанные нуклеотидные последовательности синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, 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) 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 Т4-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), $\phi 80\text{dlacZAM } 15$, ΔlacX74 , deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara,leu)769, galU, galK λ -, rpsL, nupG) и DH5a (F- $\phi 80\text{lacZAM}15$ 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.:3-9.

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 al, 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 геля-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 3,3 мг до 5 мг из 1 л питательной среды. Процесс занял около 4 дней.

2.3. Получение вирусного вектора или вируса, кодирующих гибридный белок

2.3.1. Получение вектора на основе вируса

Синтезированные гены клонировали в векторе на основе аденоассоциированного вируса pAAVK-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 2,1 мг до 3,4 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 pAAV-MCS, в которую клонировали гибридный ген, фланкированный повторами ITR; (2) плазмиду pAAV-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 pHelper, 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 pAAV-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 AAV-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 $6,3 \cdot 10^7$ клеток/фабрику. Через 24 часа после посева клеток и по достижении конfluence 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-MCSseqidno3, но им не ограничиваясь), содержащий по 1 мкг вектора, добавляли к нему растворы, содержащие паковочные плазмиды pAAV-RC plasmid и pHelper в количестве 1 мкг 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.:3-9, 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 mM NaCl, 20 mM Tris, pH=8,0 и подвергали 5 циклам замораживания при -80°C в низкотемпературном холодильнике и быстрого размораживания при $+37^{\circ}\text{C}$ на водяной бане. Затем инкубировали полученные лизаты клеток в течение часа при $+37^{\circ}\text{C}$ 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-Trar 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 1M Трис-HCl, pH8,0.

Выход рекомбинантных вирусов составил до $18 \cdot 10^6$ 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 mM Трис-HCl, pH 8.6/ 25°C , 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 5 мкл MgCl_2 (1.25 mM), 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.

Амплифицированные 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 pH 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 Macovue (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:3-9, с таких конструкций в клетках млекопитающих экспрессируется полинуклеотид по изобретению.

Выделенную генетическую конструкцию использовали у млекопитающих.

Пример 3. Получение гибридного белка

3.1. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием прокариотического организма

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *E. coli* с использованием сервиса molbiol.ru и добавив фланкирующие ген сайты рестрикции. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в бактериальном экспрессионном векторе pET22b (+) по инструкции к вектору.

Для создания штамма-продуцента использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3), содержащие в геноме λ De3 лизоген и мутацию me131. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. lon- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготавливали клетки *E. coli* штамма BL21 с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3) следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение ночи в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 сек. при 5000 об/мин. на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на электропораторе Eporator (Eppendorf, Германия) в стерильных кюветах для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм, при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мсек.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза) в течение 40 мин. при +37°C. 10–100 мкл клеточной суспензии высевали на селективную

LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую ампициллин (50 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Выросшие колонии *E. coli* проверяли на наличие плазмид со вставкой целевого гена. Клон клеток, содержащих искомую плазмидную ДНК, считали штаммом-продуцентом гибридного белка. Таким образом были получены два штамма-продуцента гибридных белков, охарактеризованных SEQ ID NO.:1, 10.

Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм. В качестве индуктора использовали 0.2% лактозу (Studier, 2005).

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудьера (Studier, 2005) использовали среду RYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы.

В среду RYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 20 часов до отсутствия существенного изменения OD_{600} за 1 час. Отбирали аликвоту клеток на анализ экспрессии гена, кодирующего гибридный белок, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Осажденные клетки лизировали с помощью 3 циклов соникации по 30 сек с перерывом в 2 мин на льду. Затем проводили разрушение телец включения путем инкубации с лизирующим буфером, содержащим 500мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 6М гуанидин гидрохлорид, 500 мМ хлористый натрий, в течение часа. К клеткам, собранным центрифугированием из 50 мл культуры, добавляли по 8 мл лизирующего буфера.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали

белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 8М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, анализировали электрофоретически в 12% ПААГ-ДДС-Na, фракции с целевым белком объединяли, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд.

Получили препараты белков (SEQ ID NO.:1, 10) чистотой около 97-98%, по данным SDS-PAGE, концентрация гибридного белка в каждом препарате составила 1-2,1 мг/мл.

Также получали гибридные белки с использованием штаммов *E.coli RosettaPLys*, а также штаммов *Bacillus subtilis*.

3.2. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием эукариотического организма

3.2.1. Получение высокоочищенного гибридного белка с использованием клеток дрожжей.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области для получения секретируемого белка, по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически.

Полученные гены клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pHIL-S1, по инструкции к вектору.

Подготавливали клетки дрожжей к трансформации. Провели культивирование и заморозку клеток *Pichia pastoris* штамма SMD1163, дефектного по нескольким протеазам дрожжей, что обеспечивает стабильность секретируемого белка. Клетки высевали в стерильных условиях на агар в среде YPD (1% - дрожжевой экстракт, 2% - пептон, 2% - глюкоза, 1 мМ дитиотреитол), культивировали при 30°C, затем пересеивали в суспензию и культивировали в течение 16 ч. Часть клеток ресуспендировали в YPD среде с добавлением 15% глицерина и замораживали при -86°C. Для получения компетентных клеток предварительно выращивали колонии клеток в чашке с агаром в YPD среде при 30°C в течение двух дней. Затем содержимое одной колонии выращивали в 10 мл YPD среды при 30°C в течение 16 ч. Разбавляли суспензию в YPD до ОП₆₀₀ 0.2 и конечного объема 10 мл и выращивали культуру до ОП₆₀₀ 0-8 в течение 4 часов. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 500 g, выливали супернатант, ресуспендировали в 10 мл раствора I из набора для трансформации EasyComp Transformation Kit, вновь центрифугировали и ресуспендировали осадок в растворе I. Аликвоты компетентных клеток по 50-200 мкл разливали в стерильные пробирки объемом 1.5 мл, которые хранили при температуре -90°C до использования.

Для трансформации использовали набор EasyComp Transformation Kit, входящий в состав Pichia Easy Select Kit (Invitrogen), реакцию проводили по инструкции к набору. Полученную суспензию клеток рассеивали в стерильную чашку на агаровый гель, приготовленный на среде YPD с добавлением 1М сорбитола и антибиотика ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Через 3 суток получили несколько десятков колоний на чашку. Клетки из выросших колоний переносили на чашку с MMD (minimal medium dextrose)-агаром и культивировали чашку 2 дня при 30°C.

Клетки выросших на селективной среде колоний переносили в колбы и культивировали в 5 мл среды MGY на качалке (250 об/мин.) в течение 1 суток до ОП₆₀₀ 5. После этого клетки осаждали центрифугированием при 3000 g 10 мин. Контроль экспрессии целевого гена осуществляли методом SDS-PAGE.

После осаждения клеток питательную среду фильтровали (диаметр пор 45 мкм), затем добавляли Трис-HCl pH 6.0 до конечной концентрации 20 мМ. Среду культивирования, содержащую гибридный белок, концентрировали в 5-10 раз, используя концентраторы для белков с молекулярной массой более 10 кДа фирмы "Millipore".

После концентрирования препарат гибридного белка нагревали на водяной бане до кипения ($t=100^{\circ}\text{C}$) и кипятили 2 минуты, после чего центрифугировали при 4°C, 15000×g 15 минут.

Проводили ионообменную хроматографию на КМ-сефарозе. Колонку с КМ-сефарозой уравнивали буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl pH 6.0. Препарат гибридного белка наносили со скоростью 60 мл/час. Колонку промывали 20 мМ Трис-HCl pH 6.0; 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 200 мМ NaCl. Элюцию проводили 20 мМ Трис-HCl pH 6.0, 1 М NaCl и собирали фракции по 1 мл.

Препарат полученного гибридного белка разбавляли в 2 раза, добавляли фосфат pH 8.0 до концентрации 50 мМ и наносили на колонку. После промывки колонки буфером нанесения балластные белки удаляли промывкой раствором 20 мМ имидазола в том же буфере. Белок элюировали раствором, содержащим 200 мМ имидазола.

В результате были получены препараты гибридных белков с чистотой выше 95%. Выявлено наличие на электрофореграммах полос, соответствующих по молекулярной массе целевым белкам. Для полученных штаммов характерен высокий уровень экспрессии целевых белков.

3.2.2. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием клеток млекопитающих.

Рассчитывали и получали нуклеотидные последовательности как описано в п.2.1.

Клонировали синтезированные гены в векторе pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору. Были созданы штаммы-продуценты данных плазмидных ДНК, по описанному в п.2.2.1. протоколу.

Трансфекцию клеток млекопитающих созданными плазмидами проводили методом кальций-фосфатного осаждения.

Для проведения трансформации клеток млекопитающих (СНО) плазмидными ДНК клетки высевали в 12-и луночные планшеты (Costar, США) с плотностью посева 5×10^4 кл/см². На следующий день для синхронизации клеточных делений культуральную среду заменяли. Через три часа к клеткам добавляли плазмидную ДНК, осажденную фосфатом кальция. Для приготовления осадка 250 мкл раствора, содержащего 50 мкг ДНК в 250 мМ CaCl₂, медленно смешивали с 250 мкл раствора (1,64% NaCl, 1,13% HEPES pH 7,12 и 0,04% Na₂HPO₄). После 24 часов инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ среду заменяли на аналогичную, содержащую 100 мкг/мл неомицина для селекции клонов, содержащих плазмиды со вставкой таргетного гена и, следовательно, экспрессирующих гибридные белки, селекцию проводили в течение 20 суток, в лунках, содержащих живые клетки, меняли среду (при этом предыдущую культуральную среду не выливали, а использовали для определения количества секретируемых белков методом ИФА), а еще через сутки клетки снимали с подложки и проводили анализ на экспрессию трансформированных генов. Анализ эффективности трансфекции проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL Beckman Coulter (Beckman Coulter, США).

Уровень гибридных белков в культуральной среде полученных стабильных трансфектом линии СНО оценивали с использованием стандартного твердофазного ИФА.

В результате клонирований были получены стабильные трансфектомы СНО, которые накапливали для криоконсервирования и наработки опытной партии гибридных белков. Продуктивность созданных трансфектом СНО, экспрессирующих гибридные белки, составила 410-550 мкг/10⁷ клеток/день.

Культивирование клеток-продуцентов осуществляли с использованием биореактора BIOSTAT® Vplus и автоклавированной среды IMDM с добавлением 45 г DFBS (0,5%) и 25,8 г (100 мМ) сульфата цинка семиводного (ZnSO₄ x 7H₂O) на 9 л среды. Задавали рабочий режим: температура 37°C, pH 6,9-7,2, концентрация кислорода 50% насыщения воздуха. После достижения заданного режима производили засев биореактора, для чего в асептических условиях в него вводили посевной материал. Время культивирования составляло 3 суток.

По окончании культивирования культуральную жидкость фильтровали через стерильную капсулу «Sartopure» («Sartorius», Германия), с диаметром пор 1,2 мкм, со

скоростью 1 л/мин. Затем осветленную жидкость концентрировали на системе Viva Flow 200 («Sartorius», Германия) с использованием фильтра. Концентрирование проводили до достижения общего объема - 200 мл.

Хроматографическую очистку проводили в два этапа, с использованием стерильных растворов. На первом этапе использовали систему BioLogic DuoFlow Pathfinder (Bio-Rad) с автоматическим коллектором фракций BioFract и полупрепаративную хроматографическую колонку YMC TriArt, 250x4,6 мм, сорбент C18. Перед началом работы колонку уравнивали с помощью 200 мл буфера (1 кг воды для инъекций и 1 г кислоты трифторуксусной) в ручном режиме через насос хроматографа на скорости 2 мл/мин.

Подготовленный материал в объеме 200 мл вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (2 кг ацетонитрила, 2 г кислоты трифторуксусной) со скоростью 0,5 мл в минуту. Собирали фракцию в максимуме поглощения при 260 нм. Объем фракции составил примерно 500 мл.

Второй этап очистки выполняли с использованием гель-хроматографической колонки BioSil SEC 125-5, 300x7,8 мм. Предварительно колонку уравнивали 0,02 М PBS-буфером. Полученный материал вносили в хроматограф через насос хроматографа на скорости 0,5 мл/мин. Элюцию производили буфером (0,6 М раствор NaCl) с градиентом концентрации от 0,1 до 0,6 М. Собирали фракцию, имеющую поглощение при A280 нм не менее 3.4 оптических единиц. Фракцию собирали во флаконы. Объем получаемого раствора для каждого препарата белка составил примерно 1 л с концентрацией гибридного белка 2-2,7 мг на 1 мл.

Гибридные белки согласно изобретению возможно получить с использованием также других клеток млекопитающих, например, HEK293, COS.

Пример использования для продукции разработанного гибридного белка клеток НЕК. Для экспрессии рекомбинантного гибридного белка использовали транзиторную трансфекцию клеток НЕК293, проведенную методом кальциевой трансфекции. Клетки НЕК293 культивировали при 37°C в CO₂ -инкубаторе (5% CO₂, влажность 100%) в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, без антибиотиков, с L-глутамином. Трансфекцию проводили при 70% конфлюэнтности монослоя. Использовали 2 мкг плазмидной ДНК в объеме 5 мл культуральной среды, через 24 часа после трансфекции заменяли среду на свежую и культивировали клетки в течение 5 суток.

3.2.3. Получение высокоочищенных гибридных белков с использованием растений.

Перевели аминокислотные последовательности рассчитанных гибридных белков в нуклеотидные, одновременно проведя кодонную оптимизацию для экспрессии в клетках *Nicotiana benthamiana* с использованием программы http://molbiol.ru/scripts/01_19.html и добавив фланкирующие ген области по инструкции к вектору для клонирования. Синтезировали рассчитанные гены химически и клонировали в эукариотическом экспрессионном векторе pTRV1. Возможно использовать и вирусный вектор (например, описанный в статье Комарова Т.В., Скулачев М.В., Зверева А.С., Шварц А.М., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2006) Новый вирус-вектор для эффективной продукции целевых белков в растениях. Биохимия, 71(8), 1043-1049).

Полученный вектор вводили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, который использовали для инфильтрации листьев *N. benthamiana*. Полученный штамм *Agrobacterium tumefaciens*, несущий гибридный ген, культивировали в течение 12 ч при 30°C в шейкере. Клетки (1,5 мл) осаждали центрифугированием (4000g, 5 мин), осадок ресуспендировали в буфере (1,5 мл: 10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.5)), ОП₆₀₀ доводили до 0,2. Наносили суспензию агробактерий шприцом без иглы на листья растущих растений *N. benthamiana*. Наблюдали максимальный уровень синтеза белков на 7-11 сутки после инфильтрации.

Экспрессию гибридных белков в клетках листьев растений-продуцентов анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с ДДС Na. Фрагмент листа растирали в буфере (10 mM KCl, 50 mM Трис pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-меркаптотанол, 0.4 M сахараза, 10% глицерин) на 10 день после заражения. Полученный экстракт подвергали центрифугированию (14000g, 10 мин), осадок и супернатант анализировали с использованием SDS-ПААГ. На электрофореграмме выявлены белки, соответствующие по молекулярному весу гибридным белкам согласно изобретению, в мембранной фракции клеток. В контроле, растениях, которые не подвергались трансформации, соответствующие белки не выявлены. Выход белков составлял около 12-14% фракции нерастворимых белков.

Исходя из полученных результатов, заявляемые гибридные белки, охарактеризованные SEQ ID NO.:1 и 10, возможно получить с использованием и прокариотических, и эукариотических клеточных систем, высокоочищенный препарат каждого белка можно получить с использованием различных типов очистки белка. Приведенные условия выделения и очистки подбирались экспериментальным путем и могут варьировать в известных среднему специалисту в этой области значениях.

Пример 4. Демонстрация эффективности разработанных вакцин

4.1. Изготовление фармацевтической композиции

Генетическую конструкцию по изобретению получали как описано в примере 2. Концентрированную генетическую конструкцию растворяли в воде для инъекций, либо в буфере - NaCl 0,9% или физиологический раствор. В одном из вариантов также добавляли бензиловый спирт до 0,3%. Получали фармацевтические композиции с концентрацией генетической конструкции от 1 до 0,1 мг/мл. Для введения с последующей электропорацией использовали только воду для инъекций.

Гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:1 и гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:10, для использования в предлагаемой фармацевтической композиции получали с использованием методов генной инженерии, как описано в примере 3, либо синтезировали химически.

Гидроксид алюминия, в форме порошка, в количестве 37 мг добавляли к 5 мл раствора гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1 или 10, 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.

Также изготавливали раствор, содержащий поли этиленимин (ПЭИ) в концентрации 1,2 мг/мл, глюкозу 10% и бензиловый спирт 0,3%, для создания набора для вакцинации. В данный набор также входила емкость с раствором с генетической конструкцией, как описано с 1 абзаце данного пункта.

В одном из вариантов для создания набора для интраназальной вакцинации использовали Раствор 1 – 0,25 мл (Генетическая конструкция 0,4 мг/мл, NaCl – 0.9%, Глюкоза – 5%, Бензиловый спирт – 0,3%) и Раствор 2 – 0,25 мл (Полиэтиленимин – 2,4 мг/мл, NaCl – 0.9%, Глюкоза – 5%, Бензиловый спирт – 0,3%).

Результаты были соотносящимися.

ПЭИ использовали преимущественно CAS Number 9002-98-6. Однако также использовали и CAS Number:49553-93-7, CAS Number: 9002-98-6, 26913-06-4. Результаты были сходными.

Растворы смешивали в одном из вариантов пипеткой, но ей не ограничиваясь.

Смешивали раствор, содержащий поли этиленимин (ПЭИ), и раствор, содержащий генетическую конструкцию, за 10-15 минут до применения. Композиция стабильна до 60 – 120 минут. Стоит отметить, что важно вводить конечную фармацевтическую композицию после образования комплекса ДНК/ПЭИ. Об образовании такого комплекса можно судить по появлению опалесценции раствора, через 10-15 минут после смешивания растворов.

При интраназальном введении важно обильно смочить слизистую носа, стараясь охватить наибольшую площадь слизистой.

Всего каждое животное получало в 1 дозе по 40 мкг гибридного белка и 50-100 мкг одной генетической конструкции, либо только генетическую конструкцию, в количестве, соразмерном количеству от 25 мкг до 1 мг на человека, с ПЭИ или без него.

4.2. Субпопуляционная структура Т-лимфоцитов

Группы наблюдения (по 15 мышей в каждой группе):

- 1 - интактные,
- 2-26 композиции на основе:
 - 2 - плазмидной ДНК pcDNA3.1(+)*seqidno3*
 - 3 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno3*
 - 4 – вирусного вектора pAAVK-EF1 α -MCS*seqidno3*
 - 5 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pcDNA3.1(+)*seqidno3*
 - 6 – аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno3*
 - 7 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno3* и гибридного белка SEQ ID NO.:1
 - 8 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno3* и гибридного белка SEQ ID NO.:10
 - 9 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pCMV-3Tag3-*aseqidno3*, и гибридного белка SEQ ID NO.:1
 - 10 – вирусного вектора pAAVK-EF1 α -MCS*seqidno3* и гибридного белка SEQ ID NO.:10
 - 11 - вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno3*, и гибридного белка SEQ ID NO.:1
 - 12 - плазмидной ДНК pVAX*seqidno4*
 - 13 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno5*
 - 14 - аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno6*
 - 15 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pcDNA3.1(+)*seqidno5*
 - 16 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno5* и гибридного белка SEQ ID NO.:1
 - 17 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-*aseqidno6* и гибридного белка SEQ ID NO.:10
 - 18 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pcDNA3.1(+)*seqidno7*, и гибридного белка SEQ ID NO.:10
 - 19 - аденоассоциированного вируса pAAV-MCS*seqidno4* и гибридного белка SEQ ID NO.:1
 - 20 - аденоассоциированного вируса, на основе pAAV-MCS*seqidno8*, и/н введение
 - 21 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pcDNA3.1(+)*seqidno9*, в/м введение + электропорация

- 22 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-aseqidno9, и/н введение
- 23 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-aseqidno9+ПЭИ, и/н введение
- 24 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-aseqidno9+ПЭИ, в/м введение
- 25 - короткой линейной конструкции, полученной амплификацией с вектора pсDNA3.1(+)-aseqidno6, и гибридного белка SEQ ID NO.:1+ПЭИ, в/м введение
- 26 - плазмидной ДНК pCMV-3Tag3-aseqidno4, где после последовательности Козак и старт-кодона и до начала гибридного гена отсутствует секреторный пептид (1-12, 73-2166 SEQ ID NO.:4).

Для иммунизации лабораторных животных использовали схему двукратного введения по дозе вакцинного кандидата внутримышечно, в квадрицепс левой конечности мыши, или интраназально, с интервалом в две недели.

В группе 21 после введения осуществляли электропорацию. В группах 20,22,23 осуществляли интраназальное введение вируса. В остальных группах осуществляли парентеральное - внутримышечное введение.

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 ("Sarstedt", 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 106 клеток на лунку.

Полученные лимфоциты окрашивали для идентификации. Содержимое каждой лунки планшета переносили в 5 мл пробирку ("Coulter", США), фосфатным буфером

(pH7,4) довели 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. Исходная концентрация антител во всех экспериментах - 100 мкг/мл. Конъюгацию проводили по инструкции производителя красителя.

Далее проводили стимуляцию полученных лимфоцитов белком SEQ ID NO.:1 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. 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). 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 белком во всех группах, кроме группы интактных животных, наблюдали увеличение относительного содержания CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, в том числе продуцирующих интерферон гамма. Различия между группами наблюдали в соотношении CD4 и CD8 Т-лимфоцитов, в том числе продуцирующих интерферон гамма, и в количестве. В группах комбинированных вакцин, где использован также гибридный белок, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1 или 10, количество CD4 Т-лимфоцитов больше превалировало 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 белком превалирование Т-хелперов увеличилось в группе интактных животных. В группах же животных, иммунизированных генетическими конструкциями, при стимуляции белком 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 коронавируса 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.

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 NKT-клетках. NKT-клетки несут и маркер CD3, они относятся к Т-клеткам, а также имеют спонтанные цитотоксические функции, похожие на таковые NK-клеток. NKT-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.

4.3. Индукция синтеза специфичных антител

Иммунизацию кроликов, возраст 9 месяцев, проводили подготовленными и описанными выше фармацевтическими композициями. Вводили генетическую конструкцию в количестве 250 мкг, концентрация 120 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 адъювантом Фрейнда, адъювант – 1/10 от объема раствора для иммунизации. Также вводили композицию, предварительно смешанную с ПЭИ, где количество ДНК было меньше, чем при аналогичной композиции для того же типа введения без ПЭИ, до 5 раз.

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 тромба, 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 °C.

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 исследованные фармацевтические композиции вызывали формирование высокого титра антител. Титр антител при введении композиций, описанных под номерами 2-26 в примере 4.2., был от 1:16 000 до 1:256 000, 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.

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

Клетки HEK293 культивировали при 37°C 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% конфлюентности 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 +4°C 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, проявлялась полоса, соответствующая по молекулярному весу рекомбинантному белку по изобретению, 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 фармацевтических композиций - 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, и с ПЭИ.

В проведенных опытах также выявили, что при одном типе введения при использовании ПЭИ результат был сходный, что и без ПЭИ, при использовании значительно меньшего количества генетической конструкции – до 5 раз. При этом применение ПЭИ позволило получить сходный эффект при использовании в 12,5 раз меньшего количества генетической конструкции при интраназальном введении, чем при неиспользовании ПЭИ и при внутримышечном введении. В то же время самое минимальное количество генетической конструкции позволило получить сходный результат при введении с использованием электропорации – до 40 раз меньшее количество, чем при внутримышечном введении без электропорации.

Также выявлена способность разработанной генетической конструкции к экспрессии кодируемого целевого гена после введения.

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, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, содержащий фрагмент белка FLT3LG и фрагменты белков M, S, N, E, nsp-2, nsp-3 нового коронавируса, соединенные гибкими мостиками.
2. Полинуклеотид, кодирующий гибридный белок по п.1.
3. Полинуклеотид по п.2, отличающийся тем, что также содержит фрагмент, кодирующий секреторную последовательность.
4. Полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что нативная секреторная последовательность белка FLT3LG охарактеризована последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:2.
5. Полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что гетерологичная секреторная последовательность выбрана из таковой ГРЧ, ТРА, IGF, ЕРО, консенсусной.
6. Полинуклеотид по п.3, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO.:3-9.
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 pcDNA3.1(+), pVAX1, pCMV-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, а также 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. Рекомбинантная клетка, содержащая генетическую конструкцию по любому из пп.7-9,11,12.

14. 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.:3-9.

15. Фармацевтическая композиция на основе генетической конструкции по любому из пп. 7-12.

16. Фармацевтическая композиция 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.:10.

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

18. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, отличающаяся тем, что является фармацевтической субстанцией.

19. Фармацевтическая композиция по п.15 или 16, отличающаяся тем, что является вакциной для профилактики и лечения коронавирусной инфекции у человека или животного.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, отличающаяся тем, что содержит генетическую конструкцию по любому из пп. 7-12 в концентрации 0,2 - 1 мг/мл и NaCl 0,9% или физиологический раствор.

21. Способ получения фармацевтической композиции по п.15, заключающийся в том, что амплифицируют генетическую конструкцию по п.10 с использованием ПЦР, очищают и разбавляют водой для инъекций или буферным раствором.

22. Набор для вакцинации, содержащий фармацевтическую композицию по пп.19 или 20 и раствор на основе ПЭИ.

23. Набор по п.22, дополнительно содержащий средство для смешивания фармацевтической композиции и раствора на основе ПЭИ.

24. Набор по пп.22 или 23, где фармацевтическая композиция содержит генетическую конструкцию по любому из пп. 7-12 в концентрации 0,2 мг/мл и NaCl

0,9% или физиологический раствор, а раствор на основе ПЭИ содержит ПЭИ в концентрации 1,2 мг/мл, глюкозу 10% и бензиловый спирт 0,3%.

25. Способ индукции специфического иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2, включающий:

- парентеральное, либо интраназальное введение в организм человека или животного фармацевтической композиции по пп.19 или 20, либо
- смешивание фармацевтической композиции по п.19 или 20 и раствора на основе ПЭИ из набора по п.22 или п.23 в течение 10-15 мин. и интраназальное, либо парентеральное введение в организм человека или животного, в эффективном количестве.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что парентерально вводят указанную фармацевтическую композицию в объеме 1 мл, с концентрацией генетической конструкции:

- 1 мг/мл, либо
- 0,2 мг/мл - после смешивания с раствором ПЭИ.

27. Способ по п.25, отличающийся тем, что интраназально вводят указанную фармацевтическую композицию в объеме 0,4 мл, с концентрацией генетической конструкции:

- 1 мг/мл, либо
- 0,2 мг/мл - после смешивания с раствором ПЭИ.

28. Способ по п.25, отличающийся тем, что парентерально вводят фармацевтическую композицию по п.19, в объеме 0,25-1 мл, с концентрацией генетической конструкции 0,1-0,2 мг/мл, далее осуществляют электропорацию.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202190992**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***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)**A61K 39/215 (2006.01)**A61P 31/14 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/165, C07K 14/52, 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), PatSeq**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), 2020-07-10 <i>формула, абз.0027-0031, SEQ ID NO: 12, 14, Табл.2, Пример 2</i>	1-28
Y	WO 2020263830 A1 (GILEAD SCIENCES, INC.), 2020-12-30 <i>пт.1, 243-248 формулы, абз.0019, 0020, 0118, 0131, 0153, 0369-0378, SEQ ID NO: 81</i>	1-28
Y	ONG EDISON et al. "COVID-19 coronavirus vaccine design using reverse vaccinology and machine learning." <i>Frontiers in immunology</i> , 2020, 11: 1581 <i>реферат, стр.6-7, Табл.3</i>	1-28
Y	DATABASE, GenBank: NC_045512, 2020-07-18, Найдено в Интернет:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1798174254 > [найдено 2021-11-23]	1-28
Y	US 2020325182 A1 (KELLER LORRAINE, PADIDAM MALLA), 2020-10-15 <i>Пример 9, абз.0378, 1528-1536</i>	1-28

☒ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - 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

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

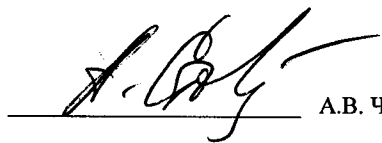
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **24/11/2021**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины


А.В. Чебан

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202190992

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." <i>Journal of Biological Chemistry</i>, 1987, 262(24): 11807-11812 <i>фиг. 1</i>	6, 17
A	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</i>, 2004, 101(26): 9804-9809 <i>весь документ</i>	1-28
A	WO 2006009011 A1 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE), 2006-01-26 <i>реферат, формула</i>	1-28
A	CN 111217920 A (HEBEI JINGSHUO BIOTECHNOLOGY CO LTD), 2020-06-02 <i>реферат, формула</i>	1-28
A	RU 2383621 C2 (Ди-Эн-Эй ШАТТЛ БАЙОФАРМ КО., ЛТД.), 2010-03-10 <i>SEQ ID NO: 1, стр.6 описания</i>	1-28