

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293443 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.19

(22) Дата подачи заявки
2020.10.01

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИММУНОГЕНЫ КОРОНАВИРУСНОГО ШИПОВИДНОГО БЕЛКА (S) И СВЯЗАННЫЕ ВАКЦИНЫ

(31) 63/045,557; 17/019,825

(32) 2020.06.29; 2020.09.14

(33) US

(86) PCT/US2020/053714

(87) WO 2022/005503 2022.01.06

(71) Заявитель:
ЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ
ИНСТИТУТ (US)

(72) Изобретатель:
Хэ Линьлин, Чжу Цзян, Уилсон
Иэн А. (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены иммуногены с измененным дизайном, полученные из растворимого S-белка коронавируса, которые стабилизированы посредством специфических модификаций в последовательностях растворимого S-белка дикого типа. Согласно настоящему изобретению также предложены вакцины на основе наночастиц, которые содержат указанные иммуногены растворимого S-белка с измененным дизайном, экспонируемые на самособирающихся наночастицах. Согласно настоящему изобретению также предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие указанные иммуногены с измененным дизайном, и вакцины на основе наночастиц. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения композиций вакцины для различных способов терапевтического применения, например, для предотвращения или лечения коронавирусных инфекций.



A1

202293443

202293443

A1

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ИММУНОГЕНЫ КОРОНАВИРУСНОГО ШИПОВИДНОГО БЕЛКА (S) И СВЯЗАННЫЕ ВАКЦИНЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет в соответствии с
5 заявкой на патент США № 17/019825 (поданной 14 сентября 2020 г., находящейся
в настоящий момент на рассмотрении) и предварительной заявкой на патент
США № 63/045557 (поданной 29 июня 2020 г., находящейся в настоящий момент
на рассмотрении). Полные описания приоритетных заявок полностью включены в
настоящую заявку посредством ссылки для любых целей.

10

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПОДДЕРЖКЕ ПРАВИТЕЛЬСТВА

[0002] Настоящее изобретение было осуществлено при государственной
поддержке в рамках грантов №№ AI139092 и AI137472, выданных
Национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает
15 определенными правами на настоящее изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Коронавирусы (CoV) представляют собой оболочечные вирусы с РНК-
геномом с положительной полярностью. В 2002 г. в Азии произошла вспышка
20 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS). В 2003 г. новый коронавирус
был идентифицирован как возбудитель SARS и впоследствии назван SARS-CoV.
Во время вспышки в 2002-2003 годах SARS-CoV инфицировал более 8000
человек с уровнем смертности ~10%. В 2012 г. был идентифицирован другой
коронавирус – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-
25 CoV). С 2012 года MERS-CoV инфицировал более 2000 человек в 27 странах с
уровнем смертности ~35%. В декабре 2019 года в Ухане, Китай, появился новый
коронавирус, обозначенный как 2019-nCoV (или SARS-CoV-2). Первые
зарегистрированные инфицированные индивидуумы, у некоторых из которых
симптомы проявились уже 8 декабря, были обнаружены среди владельцев
30 ларьков на Южно-Китайском рынке морепродуктов в Ухане. 10 января 2020 года
секвенирование генов установило, что этот новый коронавирус, β -коронавирус,
связан с MERS-CoV и SARS-CoV. 30 января 2020 года ВОЗ объявила SARS-CoV-

2 чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (PHEIC), и 11 марта 2020 года охарактеризовала ситуацию как пандемию. 24 мая 2020 года на информационной панели ВОЗ по коронавирусу (COVID-19) было показано в общей сложности 5304772 подтвержденных случая в 216 странах, областях или территориях, включая 342029 смертей. SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 принадлежат к роду β -коронавирусов и являются высокопатогенными зоонозными вирусами. Помимо этих трех высокопатогенных β -коронавирусов четыре низкопатогенных β -коронавируса HCoV-OC43, HCoV-NK229E, HCoV-NL63 и HCoV-229E также являются эндемичными у людей.

[0004] На сегодняшний день никакие терапевтические средства или вакцины не были одобрены для лечения или предотвращения любых коронавирусов, инфицирующих человека. В данной области техники существует сильная и неотложная потребность в эффективных вакцинах против коронавирусов.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение данной и других насущных потребностей в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены сконструированные иммуногенные полипептиды, которые получены или модифицированы из шиповидного (S) гликопротеина коронавирусов, включая SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. По сравнению с последовательностью растворимого S-белка дикого типа коронавируса иммуногенные полипептиды согласно настоящему изобретению содержат измененную последовательность растворимого S-белка с модификациями, которые стабилизируют структуру S-белка перед слиянием. Согласно различным вариантам реализации модификации включают (a) мутацию, которая инактивирует сайт расщепления S1/S2, и (b) мутацию в области поворота между областью гептадного повтора 1 (HR1) и областью центральной спирали (CH) (см. Фигуру 1), которая предотвращает образование прямой спирали HR1 и CH во время процесса слияния мембран. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды

согласно настоящему изобретению также содержат усечение области гептадного повтора 2 (HR2) в дополнение к стабилизирующим мутациям, указанным выше.

[0006] Некоторые иммуногенные полипептиды растворимого S-белка

согласно настоящему изобретению получены из SARS-CoV-2. Согласно

5 некоторым из указанных вариантов реализации мутация, инактивирующая сайт расщепления S1/S2, может содержать замену ⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (SEQ ID NO:19) GSAG (SEQ ID NO:20), и мутация в области поворота может содержать двойную

мутацию K986G/V987G, K986P/V987P, K986G/V987P или K986P/V987G, используя нумерацию аминокислот на основе крио-ЭМ модели PDB ID 6VSB в

10 качестве референса. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность растворимого S-белка дикого типа содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:14, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

Согласно некоторым вариантам реализации усечение HR2 влечет за собой

15 делецию остатков, показанных в SEQ ID NO:9, на C-конце последовательности растворимого S-белка дикого типа. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенные полипептиды могут дополнительно включать усечение остатков, показанных в SEQ ID NO:10, на C-конце. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенные полипептиды содержат

20 замену остатков, показанных в SEQ ID NO:10, на C-конце последовательности растворимого S-белка дикого типа остатками GNS.

[0007] Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные

полипептиды, полученные из SARS-CoV-2, согласно настоящему изобретению

могут содержать N-концевую лидерную последовательность, показанную в SEQ

25 ID NO:15. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенный

полипептид может дополнительно включать в области HR1, которая

взаимодействует с HR2, (a) одну или более замен пролином или глицином, и/или

(b) вставку одного или более аминокислотных остатков. Согласно некоторым из

указанных вариантов реализации иммуногенный полипептид может иметь одну

30 или более замен, выбранных из A942P, S943P, A944P, A942G, S943G и A944G.

Согласно некоторым из указанных вариантов реализации вставка может

представлять собой вставку G или GS между любыми остатками в A942-A944.

Согласно некоторым примерным вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из SARS-CoV-2, согласно настоящему изобретению содержат последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO:32-37, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

[0008] Некоторые иммуногенные полипептиды растворимого S-белка согласно настоящему изобретению получены из SARS-CoV. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации мутация, инактивирующая сайт расщепления S1/S2, может представлять собой замену R667G, и мутация в области поворота содержит двойную мутацию K968G/V969G, K968P/V969P, K968G/V969P или K968P/V969G, используя нумерацию аминокислот на основе UniProt ID P59594 в качестве референса. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность растворимого S-белка дикого типа содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:7, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из SARS-CoV, согласно настоящему изобретению содержат усечение HR2 (SEQ ID NO:9) на С-конце последовательности растворимого S-белка дикого типа. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенные полипептиды могут дополнительно включать усечение остатков, показанных в SEQ ID NO:10, на С-конце. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенные полипептиды содержат замену остатков, показанных в SEQ ID NO:10, на С-конце последовательности растворимого S-белка дикого типа остатками GNS.

[0009] Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из SARS-CoV, согласно настоящему изобретению могут содержать N-концевую лидерную последовательность, показанную в SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды могут дополнительно включать в области HR1, которая взаимодействует с HR2, (a) одну или более замен пролином или глицином, и/или (b) вставку одного или более аминокислотных остатков. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенный полипептид может иметь одну

или более замен, выбранных из S924P, T925P, A926P, S924G, T925G и A926G.

Согласно некоторым из указанных вариантов реализации вставка может представлять собой вставку G или GS после любого остатка в S924-A926.

[0010] Некоторые другие иммуногенные полипептиды растворимого S-белка

5 согласно настоящему изобретению получены из MERS-CoV. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации мутация, инактивирующая сайт расщепления S1/S2, может содержать двойную мутацию R748A/R751G, и мутация в области поворота содержит двойную мутацию V1060G/L1061G, V1060P/L1061P, V1060G/L1061P или V1060P/L1061G, используя нумерацию
10 аминокислот на основе UniProt ID R9UQ53 в качестве референса. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность растворимого S-белка дикого типа содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:11, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные
15 полипептиды, полученные из MERS-CoV, согласно настоящему изобретению содержат усечение HR2 (SEQ ID NO:13) на C-конце последовательности растворимого S-белка дикого типа.

[0011] Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из MERS-CoV, согласно настоящему изобретению

20 могут содержать N-концевую лидерную последовательность, показанную в SEQ ID NO:12. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды могут дополнительно включать в области HR1, которая взаимодействует с HR2, (а) одну или более замен пролином или глицином в области HR1, которая взаимодействует с HR2, в области HR1, которая
25 взаимодействует с HR2, в области HR1, которая взаимодействует с HR2, и/или (b) вставку одного или более аминокислотных остатков. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации иммуногенный полипептид может иметь одну или более замен, выбранных из T1013P, T1014P, T1015P, T1013G, T1014G и T1015G. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации вставка может
30 представлять собой вставку остатка G или GS после любого остатка в T1013-T1015.

[0012] Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из S-белка коронавируса, согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать мотив тримеризации на С-конце.

Согласно некоторым из указанных вариантов реализации мотив тримеризации

5 представляет собой фолдон или вирусный капсидный белок SHP. Согласно различным вариантам реализации применяемый мотив тримеризации может содержать последовательность фолдона, показанную в SEQ ID NO:26, или последовательность SHP, показанную в SEQ ID NO:27, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными

10 модификациями. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды, полученные из S-белка коронавируса, согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать последовательность субъединицы самособирающейся наночастицы (НЧ), которая слита с измененной последовательностью растворимого S-белка. Согласно некоторым из указанных
15 вариантов реализации С-конец измененной последовательности растворимого S-белка слит с N-концом последовательности субъединицы наночастицы.

[0013] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуногенные полипептиды, полученные из S-белка коронавируса, описанные в настоящем
20 документе. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют слитый полипептид, содержащий иммуногенный полипептид, который слит на своем С-конце с N-концом последовательности субъединицы самособирающейся наночастицы.

[0014] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены
25 композиции вакцины против коронавируса, которые содержат иммуногенный полипептид, описанный в настоящем документе, который экспонируется на поверхности самособирающейся наночастицы. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации самособирающаяся наночастица содержит тримерную последовательность, и С-конец иммуногенного полипептида слит с N-концом
30 последовательности субъединицы наночастицы. Согласно некоторым вариантам реализации применяемая самособирающаяся наночастица состоит из ферритина, E2p или I3-01. Некоторые вакцины на основе наночастиц согласно настоящему

изобретению экспонируют сконструированный шиповидный белок SARS-CoV-2, описанный в настоящем документе.

[0015] Согласно некоторым вариантам реализации вакцина на основе наночастиц содержит (1) полипептидную последовательность, содержащую от N-конца к С-концу (а) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность наночастицы I3-01v9, (b) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность наночастицы E2p, или (с) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность ферритина наночастицы; или (2) вариант полипептидной последовательности с консервативными модификациями. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации экспонируемый иммуногенный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2 содержит, по сравнению с последовательностью шиповидного белка дикого типа, (а) замену сайта расщепления S1/S2 ⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (SEQ ID NO:19) GSAG (SEQ ID NO:20), (b) двойные мутации K986G/V987G в области поворота, и (с) усечение HR2 (SEQ ID NO:9) на С-конце.

[0016] В некоторых вакцинах против SARS-CoV-2, размещенных на каркасе наночастиц, согласно настоящему изобретению экспонируемый иммуногенный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:33 или 34, или ее вариант с консервативными модификациями. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации размещенная на каркасе вакцина состоит из (1) последовательности субъединицы, содержащей от N-конца к С-концу (а) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22), последовательность наночастицы, показанную в SEQ ID NO:23 (I3-01v9), сцепляющий домен, показанный в SEQ ID NO:29 (LD7), и Т-клеточный эпитоп, показанный в SEQ ID NO:30 (PADRE), (b) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность G₄S (SEQ ID NO:21), последовательность субъединицы наночастицы, показанную в SEQ ID NO:24 (E2p), сцепляющий домен, показанный в SEQ ID NO:28 (LD4), и Т-

клеточный эпитоп, показанный в SEQ ID NO:30 (PADRE), или (с) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность G₄S (SEQ ID NO:21), последовательность наночастицы, показанную в SEQ ID NO:25 (ферритин); или

5 (2) вариант последовательности субъединицы с консервативными модификациями. Согласно некоторым вариантам реализации субъединица вакцин, размещенных на каркасе наночастиц, содержит последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO:38-40, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

10 **[0017]** Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, которые содержат композицию вакцины, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы предотвращения или лечения коронавирусной инфекции у субъекта. Указанные
15 способы включают введение субъекту фармацевтически эффективного количества композиции вакцины или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

[0018] Последующее понимание природы и преимуществ настоящего изобретения может быть достигнуто посредством ссылки на оставшиеся части
20 описания и формулу изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] На Фигуре 1 проиллюстрирована организация различных структурных мотивов коронавирусного шиповидного белка (S). Схема, показанная на фигуре,
25 отражает структуру S-белка различных коронавирусов, охватываемых настоящим изобретением, например, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Структурные домены и мотивы S-белка, показанные на фигуре, включают домены или области RBD, HR1, CH1 и HR2, а также сайт расщепления S2 (также известный как сайт расщепления S1/S2) и сайт расщепления S2'. В дополнение к различным
30 структурным компонентам S-белка, указанным на фигуре, аминокислотные остатки между HR1 и CH обозначены в настоящем документе как «область поворота».

[0020] На Фигуре 2 схематически представлен протокол иммунизации мышей. Группы из пяти мышей иммунизировали четыре раза с трехнедельными интервалами. Все вакцинные антигены (50 мкг/инъекцию) были изготовлены с использованием AddaVax, адъюванта на основе эмульсии «масло-в-воде», за исключением I3-01v9, который был изготовлен с использованием фосфата алюминия (AP). Инъекции выполняли внутрибрюшинным путем (в/б). Образцы крови собирали через две недели после каждой инъекции.

[0021] На Фигуре 3 показаны результаты для ответов антител, индуцированных вакциной против SARS-CoV-2, у мышей. Ответ связывающих антител, индуцированный вакциной на основе шиповидного белка SARS-CoV-2/шиповидного белка-НЧ. На фигуре приведена сводная информация о титрах ED₅₀, измеренных для пяти групп вакцин на основе шиповидного белка SARS-CoV-2 (S2P-5GS-1TD0, S2GΔHR2-5GS-1TD0, S2GΔHR2-5GS-FR, S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P и S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-L7P) против трех покрывающих антигенов в ИФА. Значения ED₅₀ рассчитывали в GraphPad Prism 8.4.3. Следует отметить, что значения ED₅₀ на w2 были получены путем установки нижних/верхних ограничений OD₄₅₀ на уровне 0,0/3,2 для достижения большей точности.

[0022] На Фигуре 4 показаны дополнительные результаты для ответов антител, индуцированных вакциной против SARS-CoV-2, у мышей. На фигуре приведена сводная информация о титрах ID₅₀, измеренных для пяти групп вакцин на основе шиповидного белка SARS-CoV-2 (S2P-5GS-1TD0, S2GΔHR2-5GS-1TD0, S2GΔHR2-5GS-FR, S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P и S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-L7P) против двух псевдовирусов, SARS-CoV-1-pp и SARS-CoV-2-pp, в анализах нейтрализации. Значения ID₅₀ рассчитывали в GraphPad Prism 8.4.3 с нижними/верхними ограничениями процента (%) нейтрализации, установленными на уровне 0,0/100,0.

[0023] На Фигуре 5 показаны результаты для Т-клеточных ответов, индуцированных вакциной против SARS-CoV-2, у мышей. (А)-(В): Индуцированный вакциной CD4⁺ Т-клеточный иммунитет. Спленоциты, полученные у мышей на w11, культивировали в присутствии ДК, подвергнутых импульсному воздействию шиповидного белка S2PECTO (1x10⁻⁷ mM), E2p SApNP (1x10⁻⁷ mM) и I3-01v9 SApNP (1x10⁻⁷ mM) в течение 16 часов (А) и 4 часов

(B), соответственно. (C) и (D): Индуцированный вакциной CD8⁺ Т-клеточный иммунитет. Спленоциты, полученные у мышей на w11, культивировали в присутствии ДК, подвергнутых импульсному воздействию шиповидного белка S2PECTO (1×10^{-7} мМ), E2p SApNP (1×10^{-7} мМ) и I3-01v9 SApNP (1×10^{-7} мМ) в течение 16 часов (C) и 4 часов (D), соответственно. Спленоциты от пяти наивных мышей использовали в качестве контрольных образцов и культивировали с ФСБ. На графиках показаны частоты фракции клеток. Значения Р определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Обзор

[0024] В случае SARS-CoV (также известного как SARS-CoV-1), MERS-CoV и SARS-CoV-2 вирусный геном кодирует структурные белки шиповидного белка (S), оболочки (E), мембраны (M) и нуклеокапсида (N), среди которых S-гликопротеин отвечает за связывание рецептора хозяина за счет рецепторсвязывающего домена (RBD) в его субъединице S1, а также последующее слияние мембран и проникновение вируса, управляемое его субъединицей S2. Был предложен возможный процесс слияния мембран.

Связывание рецептора может способствовать поддержанию RBD в «стоячем» состоянии, что облегчает диссоциацию субъединицы S1 от субъединицы S2. Когда субъединица S1 диссоциирует от субъединицы S2, второе расщепление S2' может высвободить пептид слияния. Соединительная область, область HR1 и центральная спираль могут образовывать чрезвычайно длинную спираль (≥ 200 Å) для вставки пептида слияния в мембрану клетки хозяина. Наконец, области HR1 и HR2 образуют спиральную структуру и соберутся в пучок из шести спиралей для совмещения мембран вируса и хозяина.

[0025] Во всех структурах S-белка перед слиянием, установленных для SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, проксимальная относительно вирусной мембраны область HR2 является невидимой, что указывает на высокую мобильность HR2. RBD содержит коровой субдомен и рецепторсвязывающий мотив (RBM). Хотя коровые субдомены обладают высоким сходством у трех

коронавирусов, их RBM заметно отличаются, что приводит к различной специфичности в отношении рецепторов: SARS-CoV и SARS-CoV-2 распознают ангиотензинпревращающий фермент 2 (АПФ-2), тогда как MERS-CoV связывается с дипептидилпептидазой 4 (DPP4). Поскольку S-гликопротеин экспонируется на поверхности и опосредует проникновение в клетки хозяина, он является основной мишенью нейтрализующих антител (НАТ) при инфекции и объектом разработки вакцин. Тримеры S-белка содержат много *N*-связанных гликанов, которые важны для правильного укладки и модулирования доступности для НАТ.

[0026] Настоящее изобретение частично основывается на исследованиях, проведенных авторами настоящего изобретения для разработки вакцин на основе наночастиц для трех высокопатогенных β -коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 на основе двух рациональных стратегий. В первой стратегии цель авторов настоящего изобретения заключалась в стабилизации тримера S-белка в конформации перед слиянием путем устранения причин метастабильности в различных областях S-белка, в частности HR1 и HR2, до его экспонирования на наночастицах. Во второй вакцинной стратегии авторы настоящего изобретения использовали систему белкового суперклея SpyTag/SpyCatcher для создания RBD-презентирующих наночастиц. Ряд иммуногенных полипептидов, полученных из S-белка, и конструкций вакцин на основе наночастиц были созданы на основе указанной конструкции и исследованы на предмет активности.

[0027] Как показано в качестве примера в настоящем документе с использованием шиповидного белка SARS-CoV-2 (и SARS-CoV-1), сконструированные иммуногенные полипептиды шиповидного белка согласно настоящему изобретению являются более стабильными и представляют собой более оптимальную конструкцию вакцины по сравнению с контрольными полипептидами без конструирования. Их предпочтительные биохимические и структурные свойства, описанные в настоящем документе, указывают на то, что они пригодны для быстрого и крупномасштабного получения вакцин в промышленных условиях. При исследовании *in vivo* было обнаружено, что сконструированные иммуногены шиповидного белка SARS-CoV-2 (например, S2G Δ HR2) более эффективно, чем несконструированный контрольный белок,

вызывают мощные ответы НАТ против SARS-CoV-2, по отдельности или при презентации на платформах самособирающихся наночастиц (SApNP). Как подробно описано в примерах в настоящем документе, примерные вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению, например, S2GΔHR2-
5 презентующие I3-01v9 SApNP, также могут вызывать сильный ответ Th1, а также другие типы Т-клеточного ответа, необходимые для защитного клеточного иммунитета. Результаты, полученные из исследований на шиповидном белке SARS-CoV-2, приведенных в качестве примера в настоящем документе, показывают, что сконструированные иммуногенные полипептиды шиповидного
10 белка согласно настоящему изобретению обеспечивают более эффективные кандидатные вакцины следующего поколения для оценки в исследованиях с участием людей.

[0028] Согласно настоящему изобретению предложены коронавирусные иммуногены и композиции вакцины в соответствии с исследованиями и
15 приведенными в качестве примера конструкциями, описанными в настоящем документе. Согласно настоящему изобретению также предложены связанные полинуклеотидные последовательности, векторы экспрессии и фармацевтические композиции. Согласно различным вариантам реализации в качестве вакцин против коронавирусов можно применять тримеры стабилизированного S-белка и
20 белки RBD в формах белка или нуклеиновой кислоты (ДНК/мРНК), переносимой вирусным вектором. Кроме того, наночастицы, презентующие тримеры стабилизированного S-белка и RBD, можно применять в качестве вакцин VLP-типа против коронавирусов.

[0029] Иммуногены и вакцины на основе коронавирусного S-белка согласно
25 настоящему изобретению обладают несколькими предпочтительными свойствами. Конструкции тримера S-белка, описанные в настоящем документе, которые презентуют консервативные нейтрализующие эпитопы в их конформации, подобной нативной, позволяют применять тримеры S-белка в качестве вакцинных антигенов или мультивалентно экспонировать на
30 наночастицах. Вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению позволяют экспонировать тримеры S-белка, полученные из трех различных коронавирусов, на хорошо известных платформах наночастиц, таких

как ферритин, E2p и I3-01, с размером в диапазоне от 12,2 до 25,0 нм. Кроме того, применение высокостабильных полых наноклеток (варианты E2p и 1VLW/I3-01) позволяет конструировать сцепляющие домены (LD), Т-клеточные эпитопы (например, PADRE) и пептидные адъюванты внутри наноклеток, что

5 обеспечивает вариант вакцины «все в одном». Все наночастицы, презентующие тример S-белка, могут быть получены в клетках ExpiCHO с высоким выходом.

Поскольку CHO является одной из главных линий клеток млекопитающих, используемых для промышленного изготовления белковых терапевтических средств и вакцин, и ExpiCHO является переходной версией этой линии клеток

10 CHO, ожидается, что наночастицы, полученные в результате производства в ExpiCHO, будут иметь свойства, аналогичные таковым при промышленном производстве в CHO. Кроме того, высокий выход S-презентирующих наночастиц, полученных в клетках ExpiCHO с помощью очистки с использованием антител и эксклюзионной хроматографии (ЭХ), позволит разработать простой, надежный и

15 экономически эффективный способ изготовления для промышленного производства.

[0030] Если в настоящей заявке не указано обратное, вакцинные иммуногены согласно настоящему изобретению, кодирующие полинуклеотиды, векторы экспрессии и клетки-хозяева, а также связанные с ними варианты

20 терапевтического применения могут быть созданы или выполнены в соответствии с процедурами, примеры которых представлены в настоящей заявке, или посредством общепринято используемых способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, руководства *Methods in Enzymology*, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); патенты США №№ 4,965,343 и 5,849,954; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing,

25 Inc., New York, USA (1986); или *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques* Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); *Current Protocols in Protein Science (CPPS)* (John

30

E.Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S.Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.) и Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R.Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998). Следующие
5 далее разделы обеспечивают дополнительное руководство для практической реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению.

[0031] Если не указано иное, выражение «по меньшей мере» или «по
10 меньшей мере один из» в контексте настоящего документа включает по отдельности каждый из перечисленных объектов после выражения и различные комбинации двух или более из перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и использования. Выражение «и/или» в связи с тремя или более
15 перечисленными объектами следует понимать как имеющее такое же значение, если из контекста не следует иное.

[0032] Использование термина «включать», «включает», «включающий»,
«иметь», «имеет», «имеющий», «содержать», «содержит» или «содержащий»,
20 включая их грамматические эквиваленты, следует понимать, в целом, как открытое и неограничивающее, например, не исключающее дополнительные
неперечисленные элементы или этапы, если иное конкретно не указано или не
понимается из контекста.

[0033] Если термин «примерно» используется перед количественным
значением, настоящее изобретение также включает конкретное количественное
значение само по себе, если конкретно не указано иное. В настоящей заявке
термин «примерно» относится к отклонению $\pm 10\%$ от номинального значения,
25 если не указано или не следует иное.

[0034] Если не указано иное, порядок этапов или порядок выполнения
определенных действий является несущественным до тех пор, пока настоящее
изобретение остается функциональным. Кроме того, два или более этапов или
действий могут выполняться одновременно.

[0035] Если не указано иное, использование любых и всех примеров или
30 приведенных в качестве примера формулировок в настоящем документе,
например, «такой как» или «включая», предназначено только для лучшего

иллюстрирования настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения. Никакие формулировки в описании не следует толковать как указывающие на любой не заявленный в формуле изобретения элемент как существенный для практического осуществления настоящего изобретения.

5

II. Определения

[0036] Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие ссылки обеспечивают для специалиста в данной области техники общее определение многих терминов, используемых согласно настоящему изобретению: *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Morris (Ed.), Academic Press (1st ed., 1992); *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); *Encyclopaedic Dictionary of Chemistry*, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); *Dictionary of Chemistry*, Hunt (Ed.), Routledge (1st ed., 1999); *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); *Dictionary of Organic Chemistry*, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); and *A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference)*, Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000).
Дополнительные пояснения некоторых из указанных терминов при их использовании применительно конкретно к настоящему изобретению предложены в настоящей заявке.

[0037] В настоящей заявке термины «антиген» или «иммуноген» используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, как правило, белка, способного индуцировать иммунный ответ у субъекта. Термин также относится к белкам, которые являются иммунологически активными в том смысле, что при введении субъекту (непосредственно или путем введения указанному субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, который кодирует белок, они способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против указанного белка. Если иное не указано, термин

«вакцинный иммуноген» используется взаимозаменяемо с терминами «белковый антиген» или «иммуногенный полипептид».

[0038] Термин «консервативно модифицированный вариант» применяется

как к аминокислотным последовательностям, так и последовательностям

5 нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей

нуклеиновых кислот консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу

10 идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой конкретный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. В случае полипептидных последовательностей «консервативно модифицированные варианты» относятся к варианту, который имеет консервативные аминокислотные замены, аминокислотные остатки,

15 замещенные другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со сходным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи со сходными зарядами, были определены в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми

20 цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[0039] Эпитоп относится к антигенной детерминанте. Эпитоп представляет собой конкретные химические группы или пептидные последовательности на молекуле, которые являются антигенными, то есть, вызывают специфичный иммунный ответ, например, эпитоп представляет собой область антигена, на

30 которую отвечают В- и/или Т-клетки. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые сблизились в результате образования третичной структуры белка.

[0040] Эффективное количество вакцины или другого агента представляет собой количество, которое является достаточным для создания желаемого ответа, такого как снижение или устранение признака или симптома состояния или заболевания, такого как пневмония. Например, эффективное количество может представлять собой количество, необходимое для ингибирования вирусной репликации или для измеримого изменения внешних симптомов вирусной инфекции. В целом, указанное количество является достаточным для измеримого ингибирования репликации или инфекционной активности вируса (например, SARS-CoV-2). При введении субъекту обычно будет применяться дозировка, которая позволит достичь целевых концентраций в ткани, которые, как было показано, обеспечивают ингибирование репликации вируса *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации «эффективное количество» представляет собой количество, которое обеспечивает лечение (включая профилактику) одного или более симптомов и/или первопричин любого расстройства или заболевания, например, лечение коронавирусной инфекции. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество представляет собой количество, которое предотвращает развитие одного или более признаков или симптомов конкретного заболевания или состояния, таких как один или более признаков или симптомов, связанных коронавирусными инфекциями.

[0041] Если не указано иное, слитый белок представляет собой рекомбинантный белок, содержащий последовательность аминокислот из по меньшей мере двух неродственных белков, которые были объединены посредством пептидной связи для получения одного белка. Таким образом, он не охватывает существующий в природе поверхностный антиген коронавирусов, который называется белком слияния (F), как описано в настоящем документе. Неродственные аминокислотные последовательности могут быть соединены непосредственно друг с другом или могут быть соединены с использованием линкерной последовательности. В настоящем документе белки являются неродственными, если их аминокислотные последовательности обычно не обнаруживаются соединенными посредством пептидной связи в их природном

окружении (например, внутри клетки). Например, аминокислотные последовательности бактериальных ферментов, таких как дигидролипоилацилтрансфераза (E2p) *B. stearothermophilus*, и аминокислотные последовательности коронавирусного растворимого S-гликопротеина обычно не
5 встречаются связанными вместе пептидной связью.

[0042] Иммуноген представляет собой белок или его часть, которая способна индуцировать иммунный ответ у млекопитающего, такого как млекопитающее, инфицированное или имеющее риск инфицирования патогеном. Введение иммуногена может привести к защитному иммунитету и/или проактивному
10 иммунитету против патогена, представляющего интерес.

[0043] Иммуногенная композиция означает композицию, содержащую иммуногенный полипептид, который индуцирует измеряемый ответ ЦТЛ (цитотоксических лимфоцитов) против вируса, экспрессирующего иммуногенный полипептид, или индуцирует измеряемый В-клеточный ответ (такой как
15 наработка антител) против иммуногенного полипептида.

[0044] Идентичность последовательности или сходство между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или двумя или более аминокислотными последовательностями выражается в значениях идентичности или сходства между последовательностями. Идентичность последовательности
20 можно измерить в значениях процентной идентичности, где более высокий процент указывает на большую степень идентичности последовательностей. Две последовательности являются «по существу идентичными», если указанные две последовательности имеют конкретный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. идентичность на 60%,
25 необязательно, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% по точно указанному участку или целой последовательности при отсутствии точно указанного участка) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по окну сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения
30 последовательностей или путем выравнивания вручную и визуальной оценки. Необязательно, идентичность представляет собой идентичность по области, которая составляет по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10

аминокислот) в длину или, более предпочтительно, по области, которая составляет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот) в длину.

[0045] Гомологи и ортологи последовательностей нуклеиновых кислот или

5 аминокислотных последовательностей обладают относительно высокой степенью идентичности последовательности/сходства при выравнивании с использованием стандартных способов. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в источниках: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; и Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. В Altschul et al., J. Mol. Biol. 15 215:403-10, 1990, предоставлено подробное рассмотрение методов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

[0046] SpyCatcher-SpyTag относится к системе лигирования белка, которая основана на характерной изопептидной связи домена CnaB2 FbaB, фибронектин-связывающем MSCRAMM и факторе вирулентности *Streptococcus pyogenes*. См., например, Terao et al., J. Biol. Chem. 2002;277:47428–47435; и Zakeri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012;109:E690–E697. В ней применяется

модифицированный домен из поверхностного белка *Streptococcus pyogenes* (SpyCatcher), который распознает когнатный 13-аминокислотный пептид (SpyTag). При распознавании они образуют ковалентную изопептидную связь 25 между боковыми цепями лизина в SpyCatcher и аспартата в SpyTag. Эта технология была использована, помимо других приложений, для создания ковалентно стабилизированных мультибелковых комплексов, для получения модульной вакцины и для мечения белков (например, для микроскопии). Система SpyTag является универсальной, поскольку метка представляет собой короткий 30 развернутый пептид, который может быть генетически слит с открытыми положениями в целевых белках; аналогичным образом, SpyCatcher может быть

слит с репортерными белками, такими как GFP, и с эпитопными метками или метками для очистки.

[0047] Термин «субъект» относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, например, человеку и не

5 представляющему собой человека млекопитающему. Примеры отличных от человека животных включают собак, кошек, крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, коз, кроликов и т.д. Если не указано обратное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Предпочтительно, субъект представляет собой человека.

10 **[0048]** Термин «лечение» или «ослабление» включает введение соединений или агентов субъекту для предотвращения или задержки начала проявления симптомов, осложнений или биохимических показателей заболевания (например, КОРОНАВИРУСНОЙ инфекции), ослабления симптомов или сдерживания или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или расстройства.

15 Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают субъектов, которые уже страдают заболеванием или расстройством, а также субъектов, которые подвержены риску развития указанного расстройства. Лечение может являться профилактическим (для предотвращения или отсрочивания манифестации заболевания или для предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов)
20 либо терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания.

[0049] Вакцина означает фармацевтическую композицию, которая вызывает профилактический или терапевтический иммунный ответ у субъекта. В некоторых случаях иммунный ответ представляет собой защитный иммунный
25 ответ. Как правило, вакцина вызывает антиген-специфичный иммунный ответ на антиген патогена, например, вирусного патогена, или на компонент клетки, связанный с патологическим состоянием. Вакцина может содержать полинуклеотид (такой как нуклеиновая кислота, кодирующая описанный антиген), пептид или полипептид (такой как описанный антиген), вирус, клетку
30 или один или более клеточных компонентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вакцины или иммуногены вакцины или композиции вакцины экспрессируются из слитых конструкций и подвергаются

самосборке в наночастицы, экспонирующие иммуногенный полипептид или белок на поверхности.

[0050] Вирусоподобная частица (virus-like particle, VLP) относится к нереплицирующейся вирусной оболочке, происходящей из любого из нескольких вирусов. VLP обычно состоят из одного или нескольких вирусных белков, таких как, без ограничения, такие белки, обозначаемые белки капсида, покрытия, оболочки, поверхности и/или оболочечные белки, или образующие частицы полипептиды, полученные из данных белков. VLP могут образовываться спонтанно после рекомбинантной экспрессии белка в соответствующей системе экспрессии. Способы получения конкретных VLP известны в данной области техники. Присутствие VLP после рекомбинантной экспрессии вирусных белков можно обнаружить с применением общепринятых методик, известных в данной области техники, например, посредством электронной микроскопии, биофизической характеристики и т.п. См., например, публикации Baker et al. (1991) *Biophys. J.* 60:1445-1456; и Hagensee et al. (1994) *J. Virol.* 68:4503-4505. Например, VLP можно выделить посредством центрифугирования в градиенте плотности и/или идентифицировать посредством характерных полос плотности. В качестве альтернативы, можно выполнять криоэлектронную микроскопию на витрифицированных образцах интересующих препаратов VLP в водных растворах и получать изображения при подходящих условиях экспозиции.

[0051] Самособирающаяся наночастица относится к белковой оболочке шаровидной формы с диаметром, составляющим десятки нанометров, и хорошо определенной поверхностной геометрией, которая формируется идентичными копиями невирусного белка, способного автономно собираться в наночастицу, имеющую сходный с VLP вид. Известные примеры включают ферритин (FR), который является консервативным у разных видов и формирует 24-членный комплекс, а также дигидролипоилацилтрансферазу *B. stearothermophilus* (E2p), люмазинсинтазу *Aquifex aeolicus* (LS) и энкапсулин *Thermotoga maritima*, все из которых образуют 60-членные комплексы. Самособирающиеся наночастицы могут образовываться спонтанно при рекомбинантной экспрессии белка в подходящей системе экспрессии. Способы получения, детектирования и

характеристики наночастиц можно осуществлять с использованием методик, аналогичных тем, которые разработаны для VLP.

III. Иммуногены коронавирусного растворимого S-белка с измененным дизайном

[0052] Согласно настоящему изобретению предложены последовательности коронавирусного растворимого S-белка с измененным дизайном или модифицированные, которые можно применять для создания композиций вакцины. Иммуногены или белки тримера растворимого S-белка с измененным дизайном стабилизируют путем введения модификаций в последовательности растворимого S-белка дикого типа коронавирусов. Некоторые конкретные последовательности растворимого S-белка дикого типа конкретных штаммов или изолятов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 приведены в настоящем документе в качестве примеров, например, SE ID NO:1-3. Из-за функционального сходства и гомологии последовательностей среди различных изолятов или штаммов данного коронавируса иммуногены растворимого S-белка с измененным дизайном, полученные из других последовательностей известных ортологов коронавирусного S-белка, также могут быть созданы в соответствии со стратегией изменения дизайна, описанной в настоящем документе. Существует много известных последовательностей коронавирусного S-белка, описанных в литературных источниках. См., например, James et al., J. Mol. Biol. 432:3309-25, 2020; Andersen et al., Nat. Med. 26:450-452, 2020; Walls et al., Cell 180:281-292, 2020; Zhang et al., J. Proteome Res. 19:1351-1360, 2020; Du et al., Expert Opin. Ther. Targets 21:131-143.; 2017; Yang et al., Viral Immunol. 27:543-550, 2014; Wang et al., Antiviral Res. 133:165-177, 2016; Bosch et al., J. Virol. 77:8801-8811, 2003; Lio et al., TRENDS-белка Microbiol. 12:106-111, 2004; Chakraborti et al., Virol. J. 2:73, 2005; и Li, Ann. Rev. Virol. 3:237-261, 2016.

[0053] Как подробно описано в настоящем документе, некоторые иммуногенные полипептиды растворимого S-белка с измененным дизайном согласно настоящему изобретению содержат мутации, которые могут повышать стабильность структуры S-белка перед слиянием. Они включают мутации, которые инактивируют сайт расщепления S1/S2, и мутации в HR1, которые

устраняют любое напряжение в области поворота между HR1 и CH, т.е. чтобы предотвратить образование прямой спирали во время слияния. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногенные полипептиды растворимого S-белка с измененным дизайном могут дополнительно содержать усечение мотива HR2. Усечение домена HR2 приводит к разрушению кора слияния HR1/HR2 и стабилизирует структуру S-белка перед слиянием.

[0054] Некоторые сконструированные иммуногенные полипептиды растворимого S-белка получены из вируса SARS-CoV-2, который вызвал COVID-19. Некоторые из этих полипептидов содержат модифицированный сайт

расщепления S1/S2. В качестве примера, последовательность растворимого S-белка дикого типа, которая будет применена для конструирования иммуногенных полипептидов SARS-CoV-2 согласно настоящему изобретению, показана в SEQ ID NO:3 или представляет собой последовательность растворимого S-белка с

усеченной N-концевой лидерной последовательностью (SEQ ID NO:14). Согласно другим вариантам реализации последовательность S-белка дикого типа, которая будет применена, может представлять собой вариант SEQ ID NO:3 или 14, например, по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями. Используя в качестве референса нумерацию аминокислот на основе крио-ЭМ модели PDB ID 6VSB или номер доступа

GenBank MN908947.3, модифицированный сайт расщепления содержит ⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷ (SEQ ID NO:18). Инактивация этого сайта расщепления может быть достигнута путем ряда изменений последовательности (например, делеций или замен) внутри или вокруг сайта. Одна мутация, которая инактивирует сайт расщепления, не воздействуя иным образом на структуру белка, представляет

собой замену остатков ⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (SEQ ID NO:19) сайта расщепления GSAG (SEQ ID NO:20), как показано в настоящем документе. Помимо инактивации сайта расщепления растворимые иммуногенные полипептиды SARS-CoV-2 могут дополнительно содержать двойную мутацию в области HR1, которая устраняет напряжение в области поворота (между мотивами HR1 и CH) во время слияния путем предотвращения образования прямой спирали. Согласно различным вариантам реализации указанная двойная мутация может представлять собой K986G/V987G, K986P/V987P, K986G/V987P или K986P/V987G.

[0055] В дополнение или альтернативно указанным выше мутациям, которые стабилизируют структуру S-белка перед слиянием, некоторые иммуногенные полипептиды SARS-CoV-2 согласно настоящему изобретению могут содержать делецию значительной части или всего домена HR2. Используя для иллюстрации приведенную в качестве примера последовательность растворимого S-белка SARS-CoV-2, показанную в SEQ ID NO:3, эта делеция может охватывать аминокислотные остатки 1150-1208 (SEQ ID NO:9). Согласно различным другим вариантам реализации делеция может представлять собой усечение первых 35, 40, 45, 50, 55 или более С-концевых остатков SEQ ID NO:3. Согласно некоторым другим вариантам реализации С-концевое усечение последовательности растворимого S-белка дикого типа может выходить за пределы домена HR2. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации один или более остатков в области, состоящей из остатков 1139-1149 (SEQ ID NO:10) из SEQ ID NO:3, также могут быть удалены. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации усеченная на С-конце последовательность растворимого S-белка может содержать вставленный трипептидный мотив, GNS, например, путем замены остатков 1139-1149 из SEQ ID NO:3 этим мотивом. Как описано в настоящем документе, функция этого трипептидного мотива заключается в увеличении выхода белка при экспонировании иммуногенного полипептида на наночастицах. Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательность растворимого S-белка может содержать N-концевую лидерную последовательность, показанную в SEQ ID NO:15.

[0056] В некоторых иммуногенных полипептидах SARS-CoV-2 согласно настоящему изобретению могут быть введены дополнительные мутации

последовательности растворимого S-белка дикого типа для дестабилизации структуры S-белка после слияния. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более замен пролином и/или глицином могут быть сконструированы в области HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния.

Функция этих мутаций заключается в разрушении кора слияния с

шестиспиральным пучком. Согласно различным вариантам реализации мутации могут включать A942P, S943P, A944P, A942G, S943G и A944G. Согласно некоторым вариантам реализации один или более дополнительных

аминокислотных остатков могут быть вставлены в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Аналогичным образом, функция этих вставок также заключается в разрушении спирального профиля кора слияния. Согласно различным вариантам реализации вставки могут

5 включать вставку G или GS между любыми остатками в A942-A944.

[0057] Как подробно описано в Примерах в настоящем документе, несколько конкретных сконструированных иммуногенных полипептидов шиповидного белка SARS-CoV-2 продемонстрировали повышенные иммуногенные свойства относительно полипептида эктодомена шиповидного белка SARS-CoV-2 дикого

10 типа или хорошо известного полипептида шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащего двойную мутационную замену пролином («S2P»). Один из приведенных в качестве примера полипептидов шиповидного белка SARS-CoV-2 представляет собой S2GΔHR2, показанный в SEQ ID NO:32. По сравнению с последовательностью эктодомена шиповидного белка SARS-CoV-2 дикого типа

15 (SEQ ID NO:3) S2GΔHR2 содержит замену последовательности сайта расщепления S1/S2⁶⁸²RRARSV⁶⁸⁷ (SEQ ID NO:31), замененную GSAGSV (SEQ ID NO:18). Он также содержит двойную мутацию K986G/V987G в HR1. Кроме того, в нем удалена область HR2 (E1150-Q1208). Как описано в настоящем

документе, указанный сконструированный иммуногенный полипептид

20 шиповидного белка SARS-CoV-2 продуцировал тримеры высокой чистоты, что указывает на значительное снижение метастабильности шиповидного белка. Он также показал более высокую аффинность в отношении типичных МАТ,

специфичных в отношении шиповидного белка, в анализах методами ИФА и интерферометрии биослоя (BLI). При экспонировании на каркасах на основе

25 самособирающихся наночастиц этот сконструированный белок показал удовлетворительный выход, чистоту, стабильность при получении и структурную целостность, в то время как шиповидный белок дикого типа и широко используемый шиповидный белок с двойной мутационной заменой пролином не смогли экспрессироваться ни на одном каркасе на основе наночастиц. S2GΔHR2,

30 экспонируемый на наночастице, также показал улучшенную антигенность при тестировании против панели МАТ/НАТ. При исследовании *in vivo* вакцины на основе наночастиц, экспонирующие этот сконструированный шиповидный белок,

также вызывали ответы нейтрализующих антител, которые было до 10 раз сильнее, чем у контрольных НЧ.

[0058] Последовательность сконструированного шиповидного белка SARS-CoV-2 «S2GΔHR2» (SEQ ID NO:32) показана ниже. В данной последовательности

- 5 N-концевая лидерная последовательность выделена курсивом, мутированный сайт расщепления S1/S2 выделен подчеркиванием, и замененные остатки ⁹⁸⁶GG⁹⁸⁷ выделены подчеркиванием и курсивом.

*MFVFLVLLPLVSSQCVNL*TTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLF
LPFFSNVTWFHAIHVS⁹⁸⁶GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTL
10 DSKTQSL⁹⁸⁷LIVNNATNVVIK⁹⁸⁸VCE⁹⁸⁹FQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSA
NNCTFEYVSQPF⁹⁹⁰LM⁹⁹¹DLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLP
QGFSALEPLVDLPIGINITRFQ⁹⁹²TLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQ
PRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSE⁹⁹³TKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESI
VRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL⁹⁹⁴YNSASFSTFKCY
15 GVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV⁹⁹⁵RQIAPGQTGKIADYNYKL⁹⁹⁶PDDFTGCVI
AWNSNNLDSKVGGN⁹⁹⁷NYLYRLFRKSNLKPFERDISTE⁹⁹⁸IYQAGSTPCNGVEGFN
CYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL⁹⁹⁹SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN
FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ¹⁰⁰⁰QFGRDIADTTDAVRDPQ¹⁰⁰¹TLEILDITPCSF¹⁰⁰²GGV
SVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAG
20 CLIGAEHVNN¹⁰⁰³SYECDIPIGAGICASYQTQ¹⁰⁰⁴TNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAEN
SVAYSNN¹⁰⁰⁵SI¹⁰⁰⁶AIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSF
CTQLNRALTGIAVEQDKNTQE¹⁰⁰⁷VFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSK
RSFIEDLLFNK¹⁰⁰⁸VT¹⁰⁰⁹LADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQK
25 LIANQFNSAIGKIQDSL¹⁰¹⁰SSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS
VLNDILSRLDGGEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM
SECVLGQSKRVDFCGKGYHLM¹⁰¹¹SFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAIC
HDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQII¹⁰¹²TTDNTFVSGNCDVVIGIVNNT
VYDPLQPELDSFK

- 30 **[0059]** Некоторые сконструированные иммуногенные полипептиды растворимого S-белка получены из вируса SARS-CoV. Некоторые из этих полипептидов содержат модифицированный сайт расщепления S1/S2. В качестве

примера, последовательность растворимого S-белка дикого типа, которая будет применена для конструирования иммуногенных полипептидов SARS-CoV согласно настоящему изобретению, показана в SEQ ID NO:1 или представляет собой последовательность растворимого S-белка с усеченной N-концевой

5 лидерной последовательностью (SEQ ID NO:7). Согласно другим вариантам реализации последовательность S-белка дикого типа, которая будет применена, может представлять собой вариант SEQ ID NO:1 или 7, например, по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями. Используя в качестве референса нумерацию аминокислот на

10 основе UniProt ID P59594 или номера доступа GenBank NP_828851, модифицированная последовательность может содержать замену R667G, что приводит к инактивации сайта расщепления S1/S2. Помимо инактивации сайта расщепления растворимые иммуногенные полипептиды SARS-CoV могут

15 дополнительно содержать двойную мутацию в области HR1, которая устраняет напряжение в области поворота путем предотвращения образования прямой спирали во время слияния. Согласно различным вариантам реализации указанная двойная мутация может представлять собой K968G/V969G, K968P/V969P, K968G/V969P или K968P/V969G.

[0060] В дополнение или альтернативно указанным выше мутациям, которые

20 стабилизируют структуру S-белка перед слиянием, некоторые иммуногенные полипептиды SARS-CoV согласно настоящему изобретению могут содержать делецию значительной части или всего домена HR2. Используя для иллюстрации приведенную в качестве примера последовательность растворимого S-белка SARS-CoV, показанную в SEQ ID NO:1, эта делеция может охватывать

25 аминокислотные остатки 1132-1190 (SEQ ID NO:9). Согласно различным другим вариантам реализации делеция может представлять собой усечение первых 35, 40, 45, 50, 55 или более C-концевых остатков SEQ ID NO:1. Согласно некоторым другим вариантам реализации C-концевое усечение последовательности растворимого S-белка дикого типа может выходить за пределы домена HR2.

30 Согласно некоторым из указанных вариантов реализации один или более остатков в области, состоящей из остатков 1121-1131 (SEQ ID NO:10) из SEQ ID NO:1, также могут быть удалены. Согласно некоторым из указанных вариантов

реализации усеченная на С-конце последовательность растворимого S-белка может содержать вставленный трипептидный мотив, GNS, например, путем замены остатков 1121-1131 из SEQ ID NO:1 этим мотивом. Как описано в настоящем документе, функция этого трипептидного мотива заключается в увеличении выхода белка при экспонировании иммуногенного полипептида на наночастицах. Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательность растворимого S-белка может иметь усеченную N-концевую лидерную последовательность.

[0061] В некоторых иммуногенных полипептидах SARS-CoV согласно настоящему изобретению могут быть введены дополнительные мутации последовательности растворимого S-белка дикого типа для дестабилизации структуры S-белка после слияния. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более замен пролином и/или глицином могут быть сконструированы в области HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния.

Функция этих мутаций заключается в разрушении кора слияния с шестиспиральным пучком. Согласно различным вариантам реализации мутации могут включать S924P, T925P, A926P, S924G, T925G и A926G. Согласно некоторым вариантам реализации один или более дополнительных аминокислотных остатков могут быть вставлены в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Аналогичным образом, функция этих вставок также заключается в разрушении спирального профиля кора слияния. Согласно различным вариантам реализации вставки могут включать вставку G или GS между любыми остатками в A924-A926.

[0062] Некоторые сконструированные иммуногенные полипептиды растворимого S-белка получены из вируса MERS-CoV. Некоторые из этих полипептидов содержат модифицированный сайт расщепления S1/S2. В качестве примера, последовательность растворимого S-белка дикого типа, которая будет применена для конструирования иммуногенных полипептидов MERS-CoV согласно настоящему изобретению, показана в SEQ ID NO:2 или представляет собой последовательность растворимого S-белка с усеченной N-концевой лидерной последовательностью (SEQ ID NO:11). Согласно другим вариантам реализации последовательность S-белка дикого типа, которая будет применена,

может представлять собой вариант SEQ ID NO:2 или 11, например, по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями. Используя в качестве референса нумерацию аминокислот на основе UniProt ID R9UQ53 или номера доступа GenBank JX869059.2,

- 5 модифицированная последовательность может содержать двойную мутацию R748A/R751G, что приводит к инактивации сайта расщепления S1/S2. Помимо инактивации сайта расщепления растворимые иммуногенные полипептиды MERS-CoV могут дополнительно содержать двойную мутацию в области HR1, которая устраняет напряжение в области поворота путем предотвращения
- 10 образования прямой спирали во время слияния. Согласно различным вариантам реализации указанная двойная мутация может представлять собой V1060G/L1061G, V1060P/L1061P, V1060G/L1061P или V1060P/L1061G.

- [0063]** В дополнение или альтернативно указанным выше мутациям, которые стабилизируют структуру S-белка перед слиянием, некоторые иммуногенные
- 15 полипептиды MERS-CoV согласно настоящему изобретению могут содержать делецию значительной части или всего домена HR2. Используя для иллюстрации приведенную в качестве примера последовательность растворимого S-белка MERS-CoV из SEQ ID NO:2, эта делеция может охватывать аминокислотные остатки 1229-1291 (SEQ ID NO:13). Согласно различным другим вариантам
- 20 реализации делеция может представлять собой усечение первых 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более С-концевых остатков SEQ ID NO:2. Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательность растворимого S-белка может иметь усеченную N-концевую лидерную последовательность.

- [0064]** В некоторых иммуногенных полипептидах MERS-CoV согласно
- 25 настоящему изобретению могут быть введены дополнительные мутации последовательности растворимого S-белка дикого типа для дестабилизации структуры S-белка после слияния. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более замен пролином и/или глицином могут быть сконструированы в области HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния.
- 30 Функция этих мутаций заключается в разрушении кора слияния с шестиспиральным пучком. Согласно различным вариантам реализации мутации могут включать T1013P, T1014P, T1015P, T1013G, T1014G и T1015G. Согласно

некоторым вариантам реализации один или более дополнительных аминокислотных остатков могут быть вставлены в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Аналогичным образом, функция этих вставок также заключается в разрушении спирального профиля
5 кора слияния. Согласно различным вариантам реализации вставки могут включать вставку G или GS между любыми остатками в T1013-T1015.

[0065] В дополнение к различным заменам и делециям, указанным выше, сконструированные иммуногенные полипептиды коронавируса растворимого S-белка согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать
10 мотив тримеризации на С-конце. Подходящие мотивы тримеризации согласно настоящему изобретению включают, например, фолдон фибритина T4 (PDB ID: 4NCV) и вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0). Фибритин T4 (фолдон) хорошо известен в данной области техники и состоит из 30 С-концевых аминокислотных остатков тримерного белка фибритина из бактериофага T4 и
15 способствует укладке и тримеризации фибритина. См., например, Papanikolopoulou et al., J. Biol. Chem. 279: 8991-8998, 2004; и Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915, 2004. Аналогичным образом, белок SHP и его применение в качестве функционального мотива тримеризации также хорошо известно в данной области техники. См., например, Dreier et al., Proc Natl Acad Sci USA 110:
20 E869–E877, 2013; и Hanzelmann et al., Structure 24: 140–147, 2016. Конкретные последовательности фолдона и SHP, приведенные в качестве примера в настоящем документе, представляют собой

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (фолдон; SEQ ID NO:26) и
EVRIFAGNDPAHTATGSSGSSPTPALTPLMLDEATGKLVVWDGQKAGSAVGIL
25 VLPLEGTETALTYKSGTFATEAIHWPEVDENKKANAFAGSALSHAA (1TD0; SEQ ID NO:27). Согласно некоторым вариантам реализации мотив тримеризации соединен с иммуногенным полипептидом растворимого S-белка с измененным дизайном коротким линкером GS. Включение линкера предназначено для стабилизации образованной тримерной молекулы. Согласно различным
30 вариантам реализации линкер может содержать 1-6 tandemных повторов GS. Согласно некоторым вариантам реализации к С-концу мотива тримеризации

может быть добавлена His6-метка, чтобы облегчить очистку белка, например, с помощью колонки с никелем.

[0066] В дополнение к S2GΔHR2, описанному выше, другие примерные сконструированные шиповидные белки SARS-CoV-2 согласно настоящему изобретению показаны в SEQ ID NO:33-37. SEQ ID NO:33 представляет собой последовательность S2GΔHR2 без N-концевой лидерной последовательности. Слияния этой последовательности с фолдоном мотива тримеризации (SEQ ID NO:26) и 1TD0 (SEQ ID NO:27) показаны в SEQ ID NO:35 и 36, соответственно. В каждой из этих двух слитых последовательностей сайт рестрикции AS введен на С-конце сконструированного шиповидного белка, который затем соединяется с N-концом мотива тримеризации за счет линкера G₄S. SEQ ID NO:34 представляет собой вариант SEQ ID NO:33, содержащий замену HR1. В частности, область HR1 L922-S943 заменена эквивалентной областью из шиповидного белка SARS-CoV-1. Как приведено в качестве примера в настоящем документе, слияния, содержащие указанный шиповидный белок SARS-CoV-2 с заменой HR1 мотивом тримеризации (например, 1TD0), также проявляли удовлетворительные иммуногенные свойства только при удалении стебля HR2. Одно такое слияние показано в SEQ ID NO:37. Любую из этих приведенных в качестве примера последовательностей, их по существу идентичных последовательностей или консервативно модифицированных вариантов можно применять в настоящем изобретении для разработки вакцин против SARS-CoV-2, например, вакцин, размещенных на каркасах наночастиц.

[0067] Последовательность сконструированного шиповидного белка SARS-CoV-2: S2GΔHR2 (без N-концевой лидерной последовательности) (SEQ ID

NO:33):

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNN
ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
PIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENG
TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCFPG
EVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF

TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
 LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
 5 VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSNVFQTRAGCLIGAEHVNS
 YECDIPGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
 TNFTISVTTEILPVSMKTSTVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLNRALTGI
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLA
 10 GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREG
 VFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
 15 FK

[0068] Последовательность слияния S2GAHR2-фолдон (SEQ ID NO:35). В
 указанной последовательности введенный сайт рестрикции AS выделен курсивом
 и подчеркиванием, линкер G₄S выделен курсивом, и последовательность фолдона
 выделена подчеркиванием.

20 QCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
 IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNN
 ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
 LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
 PIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRFTLLKYNENG
 25 TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
 EVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
 TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
 30 LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
 VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSNVFQTRAGCLIGAEHVNS
 YECDIPGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP

TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLA
 GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 5 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREG
 VFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
 FKASGGGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

- 10 [0069] Последовательность слияния S2GΔHR2-1TD0 (SEQ ID NO:36). В
 указанной последовательности введенный сайт рестрикции AS выделен курсивом
 и подчеркиванием, линкер G₄S выделен курсивом, и последовательность 1TD0
 выделена подчеркиванием.

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
 15 IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNN
 ATNVVIKVC EFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
 LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
 PIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENG
 TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
 20 EVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNASFSSTFKCYGVSPTKLNDLCF
 TNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
 LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
 25 VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNS
 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
 TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLA
 30 GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV

DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREG
VFVSNGTHWFTVQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
FKASGGGGSEVRIFAGNDPAHTATGSSGISSPTALTPLMLDEATGKLVVWDGQ
KAGSAVGILVLPLEGTETALTYYKSGTFATEAIHWPESVDEHKKANAFAGSALS

5 HAA

[0070] Последовательность S2GΔHR2 (SEQ ID NO:34) с заменой HR1:

заменяющая область HR1 из SARS-CoV-1 подчеркнута.

QCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNN
10 ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
PIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRFTLLKYNENG
TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
EVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
15 TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
GGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNS
20 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIP
TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLA
GTITSGWTFGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAIS
25 QIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREG
VFVSNGTHWFTVQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
FK

30 **[0071]** Последовательность слияния S2GΔHR2 с обменом HR1 на 1TD0 (SEQ
ID NO:37). В указанной последовательности введенный сайт рестрикции AS

выделен курсивом и подчеркиванием, линкер G₄S выделен курсивом, и последовательность 1TD0 выделена подчеркиванием.

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNN
5 ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
PIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENG
TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
EVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
10 TNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
GGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNS
15 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLL TDEMIAQYTSALLA
GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAIS
20 QIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICH DGKAHFPREG
VFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
FK4SGGGGSEVRIFAGNDPAHTATGSSGISSPTPAL TPLMLDEATGKL VVWDGQ
25 KAGSAVGILVLPLEGTETALTYYKSGTFATEAIHWPESVDEHKKANAFAGSALS
HAA

IV. Экспонируемые на наночастицах композиции вакцины против коронавируса

30 **[0072]** Согласно настоящему изобретению предложены композиции вакцины, которые содержат гетерологичный каркас, экспонирующий по меньшей мере один иммуногенный полипептид или тримерный белок, полученный из

коронавирусных S-белков. Согласно некоторым вариантам реализации применяемый иммуноген S-белка коронавируса представляет собой стабилизированный полипептид растворимого S-белка, содержащий различные стабилизирующие мутации, описанные выше. Согласно некоторым другим

5 вариантам реализации применяемый иммуноген коронавируса содержит или получен из домена RBD коронавирусных S-белков. В последних вариантах реализации применяют систему лигирования SpyTag/SpyCatcher. Как подробно описано в Примерах в настоящем документе, последовательность RBD может быть слита с мотивом SpyTag, а последовательность субъединицы наночастицы

10 может быть слита с мотивом SpyCatcher. В качестве альтернативы, последовательность RBD может быть слита с мотивом SpyCatcher, а последовательность субъединицы наночастицы может быть слита с мотивом SpyTag. В приведенных в качестве примера вариантах реализации применяемая последовательность RBD может содержать последовательность, показанную в

15 любой из SEQ ID NO:4-6, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями. При введении двух конструкций, экспрессирующих слияние SpyTag и слияние SpyCatcher в клетки-хозяева или клетки продуцента, вакцины на основе наночастиц, экспонирующие массив белков RBD на поверхности, будут созданы в результате опосредуемого

20 SpyTag/SpyCatcher лигирования белков RBD в самособранные наночастицы.

[0073] Любой гетерологичный каркас можно применять для презентирования иммуногенного белка или полипептида в конструкции вакцин согласно настоящему изобретению. Указанные каркасы включают вирусоподобную частицу (VLP), такую как VLP на основе бактериофага Q β и наночастицы. При

25 создании композиций вакцины согласно настоящему изобретению можно применять различные платформы наночастиц. В целом, для образования наночастиц, применяемых в настоящем изобретении, требуется множество копий одной субъединицы. Наночастицы, как правило, имеют шарообразную форму и/или имеют осевую симметрию (например, с осью 3-го и 5-го порядка),

30 например, с икосаэдрической структурой, приведенной в качестве примера в настоящем документе. Дополнительно или в качестве альтернативы, аминоконец субъединицы частицы должен быть экспонирован и должен находиться в

непосредственной близости от оси симметрии третьего порядка, и расстояние между тремя аминоконцами должно точно соответствовать расстоянию между карбоксиконцами экспонируемого тримерного стабилизированного растворимого S-белка.

- 5 **[0074]** Согласно различным вариантам реализации применяемые самособирающиеся наночастицы имеют диаметр примерно 25 нм или менее (обычно собранные из 12, 24 или 60 субъединиц) и оси симметрии третьего порядка на поверхности частицы. Такие наночастицы обеспечивают подходящие платформы частиц для получения мультивалентных вакцин. Согласно некоторым
- 10 предпочтительным вариантам реализации иммуногенный белок или полипептид коронавируса может быть презентован на самособирающихся наночастицах, таких как самособирающиеся наночастицы, полученные на основе ферритина (FR) или E2p, как приведено в качестве примера в настоящем документе. Другие примеры наночастиц, подходящих согласно настоящему изобретению, включают
- 15 наночастицы, полученные из I3-01. Хорошо известный и обычно используемый в данной области техники ферритин представляет собой глобулярный белок, обнаруженный у всех животных, бактерий и растений. Как хорошо известно в данной области техники, его действие заключается главным образом в контроле скорости и локализации образования полинуклеарного $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ посредством
- 20 транспортирования гидратированных ионов железа и протонов в минерализованный кор и из него. Глобулярная форма ферритина образована из мономерных субъединичных белков (также обозначаемых «мономерные субъединицы ферритина»), которые представляют собой полипептиды с молекулярной массой приблизительно 17-20 кДа. E2p представляет собой
- 25 вариант с измененным дизайном дигидролипоилацилтрансферазы из *Bacillus stearothermophilus*, который, как было показано, подвергается самосборке в термостабильную 60-членную наночастицу. См., например, He et al., Nat. Commun. 7:12041, 2016. Подобным образом, I3-01 представляет собой сконструированный белок, который может подвергаться самосборке в гиперстабильные наночастицы. См.,
- 30 например, Hsia et al., Nature 535, 136-139, 2016. Последовательности субъединиц указанных белков известны в данной области техники. См., например, WO2017/192434. Более подробная информация о структурных и функциональных свойствах различных каркасов наночастиц, а также их применении при презентации тримерных белковых

иммуногенов, представлена в данной области техники. См., например, WO2017/192434, WO2019/089817 и WO2019/241483. Согласно различным вариантам реализации в композициях вакцины против коронавируса согласно настоящему изобретению можно применять любые из указанных известных наночастиц, а также их консервативно модифицированные варианты или варианты, имеющие по существу идентичные последовательности (например, идентичные по меньшей мере на 90%, 95% или 99%).

[0075] Помимо последовательностей наночастиц, указанных выше, при практическом осуществлении настоящего изобретения также можно применять многие другие наночастицы или VLP, известные в данной области техники. Они включают, например, люмазинсинтазу Aquifex aeolicus, энкапсулин Thermotoga Maritima, энкапсулин Mucosoccus xanthus, вирусную частицу бактериофага Qbeta, частицу вируса Flock House (FHV), частицу вируса ORSAY и частицу вируса инфекционного бурсита (IBDV).

[0076] Согласно некоторым примерным вариантам реализации вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению содержат последовательность субъединицы наночастицы, показанную в SEQ ID NO:23 (I3-01v9), SEQ ID NO:24 (E2p) или SEQ ID NO:25 (ферритин), ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность. Как правило, С-конец сконструированного иммуногенного полипептида коронавируса слит с N-концом субъединицы самособирающейся наночастицы (НЧ). Согласно некоторым вариантам реализации С-конец сконструированного полипептида коронавируса слит с последовательностью субъединицы наночастицы самособирающейся наночастицы за счет линкерной последовательности GS, например, G₄S (GGGGS, SEQ ID NO:21) или (G₄S)₂ (GGGSGGGGS; SEQ ID NO:22).

[0077] Последовательность субъединицы I3-01v9 (SEQ ID NO:23)
MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALAVFVGGVHLIEITFTVPDADTVIK
ELSFLKELGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYM
PGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVK FVPTGGVN
LDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKG TIAEVA AKA AAFVEKIRGCTE

[0078] Последовательность субъединицы E2p (SEQ ID NO:24)
AAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSKHTAPHVTLMDADVTKLV
AHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTAIDDETEEIIQKHYY

NIGIAADTDRGLLVPVIKHADRKPIFALAEINELAEKARDGKLTPGEMKGASC
TITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAIEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHR
MIDGATAQKALNHIKRLSDPELLLM

[0079] Последовательность ферритина (SEQ ID NO:25)

5 DIIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHA
LIIFLNENNVQVQLTSISAPENKFEGLTQIFQKAYENEQHISESINNIVDHA
HATFNFLQWYVAEQHEEEVLFDKIDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRK

[0080] Помимо экспонируемого иммуногена растворимого S-белка

композиции вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению
10 могут включать дополнительные мотивы для улучшения биологических или
фармацевтических свойств. Указанные дополнительные структурные
компоненты могут служить для облегчения экспонирования иммуногена на
поверхности наночастиц, для повышения стабильности экспонируемых
иммуногенов и/или для улучшения выхода и чистоты вакцин на основе
15 самособираемых белков. Согласно указанным вариантам реализации один или
более линкеров (линкерных последовательностей, мотивов или фрагментов)
можно применять для соединения различных структурных компонентов в
конструкциях.

[0081] Согласно некоторым вариантам реализации вакцины на основе
20 наночастиц согласно настоящему изобретению могут содержать
последовательность, кодирующую белковый домен, который служит для
стабилизации иммуногенного полипептида, такой как мотив тримеризации
фибрилина Т4 («фолдон»), как указано выше, или для возвышения
иммуногенного полипептида над поверхностью наночастицы, такой как
25 трехспиральный пучок («переходный домен»), или для облегчения
иммуноаффинной очистки, такой как белковый домен с известными
связывающими антителами. Эти последовательности могут быть добавлены
между последовательностью иммуногенного полипептида и
последовательностью субъединицы наночастицы.

30 **[0082]** Согласно некоторым из указанных вариантов реализации мотив
тримеризации, такой как фолдон и вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0),
может быть добавлен к С-концу стабилизированного растворимого S-белка,

приведенного в качестве примера в настоящем документе. Как описано выше, мотив тримеризации может быть вставлен с помощью короткого линкера GS для дальнейшей стабилизации тримера, а также для увеличения соотношения тримера в общем выходе белка. Согласно некоторым вариантам реализации

- 5 последовательность, кодирующая полипептидный фрагмент или мотив, который служит в качестве активного сайта для химической конъюгации, может быть вставлена в конструкцию в соответствующем положении. Согласно некоторым вариантам реализации дополнительные структурные компоненты, такие как эпитоп CD4⁺ Т-хелперов или эпитоп CD8⁺ Т-клеток, также могут быть вставлены
- 10 в конструкцию наночастицы в соответствующем положении. Они включают, например, эпитоп Т-хелперов PADRE (AKFVAAWTLKAAA; SEQ ID NO:30), приведенный в качестве примера в настоящем документе. Согласно некоторым примерным вариантам реализации эпитоп Т-хелперов может быть вставлен на С-конце сцепляющего домена, который, в свою очередь, слит с С-концом
- 15 последовательности субъединицы НЧ, описанной ниже.

- [0083]** Согласно некоторым вариантам реализации вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению могут содержать сцепляющий домен, который стабилизирует наночастицу. Последовательность, кодирующая сцепляющий домен, может быть слита прямо или опосредовано с С-концом
- 20 последовательности, кодирующей субъединицу наночастицы. Сцепляющий домен стабилизирует наночастицы изнутри таким образом, чтобы наночастицы, презентирующие коронавирусный иммуногенный полипептид, могли оставаться интактными во время изготовления, изготовления вакцины и иммунизации.
- Иммуногены вакцины на основе наночастиц, сконструированные таким образом,
- 25 обладают значительно повышенной стабильностью. Обычно сцепляющий домен, подходящий для настоящего изобретения, представляет собой белковую субъединицу, которая в естественных условиях может образовывать димер с другой белковой субъединицей в растворе посредством нековалентных взаимодействий на контактной поверхности. Согласно некоторым
- 30 предпочтительным вариантам реализации две белковые субъединицы могут быть идентичными по последовательности и образовывать гомодимер. Согласно некоторым другим вариантам реализации две белковые субъединицы могут

представлять собой различные белки или два различных домена одного белка, полученных путем конструирования, которые могут образовывать гетеродимер в растворе посредством нековалентных взаимодействий на контактной поверхности. Как правило, сцепляющий домен ковалентно слит с субъединицей наночастицы, с которой связан указанный иммуногенный полипептид. Примеры конкретных сцепляющих доменов и рекомендации по применению сцепляющего домена при конструировании наночастицы, экспонирующей тримерные иммуногены, можно найти в данной области техники, например, WO2019/241483. Согласно некоторым примерным вариантам реализации применяемый LD содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:28 (LD4) или 29 (LD7), ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность.

[0084] Сцепляющий домен LD4 (SEQ ID NO:28):

FSEEQKKALDLAFYFDRRLTPEWRRYLSQRLGLNEEQIERWFRRKEQQIGWSH
PQFEK

[0085] Сцепляющий домен LD7 (SEQ ID NO:29):

SPAVDIGDRLDELEKALEALSAEDGHDDVGQRLESLLRRWNSRRAD

[0086] Наночастицы, экспонирующие любые из стабилизированных

иммуногенов коронавируса растворимого S-белка, описанных в настоящем документе (например, стабилизированные иммуногены тримера растворимого S-белка SARS-CoV-2), могут быть сконструированы путем слияния иммуногенного полипептида или субъединицы мультимерного иммуногенного белка (например, тримерного иммуногена) с субъединицей наночастицы (например, субъединицей E2p или I3-01), а также другими необязательными или альтернативными компонентами, описанными в настоящем документе (например, сцепляющим доменом или мотивом тримеризации). Для конструирования наночастицы, экспонирующей слитые вакцинные иммуногены согласно настоящему изобретению, можно применять один или более линкерных мотивов или фрагментов, чтобы облегчить соединение и поддержание структурной целостности различных компонентов. Как правило, линкерные мотивы содержат короткие пептидные последовательности, например, богатые GS пептиды. Согласно различным вариантам реализации линкеры или линкерные мотивы

могут представлять собой любые гибкие пептиды, которые соединяют два белковых домена или мотива, не препятствуя их функциям. Например, применяемый линкер может представлять собой 5-аминокислотный линкер G₄S (SEQ ID NO:21) или 10-аминокислотный линкер (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22),

5 приведенные в качестве примера в настоящем документе, для соединения (1) шиповидного белка и последовательности каркаса наночастицы, (2) шиповидного белка и мотива тримеризации, и/или (3) последовательности каркаса наночастицы и последовательности сцепляющего домена. Согласно некоторым вариантам реализации дипептидный линкер GS можно применять для соединения

10 сцепляющего домена с эпитопом Т-клеток, как показано в качестве примера в настоящем документе. Подробные процедуры рекомбинантного получения композиций вакцины согласно настоящему изобретению могут быть основаны на протоколах, описанных в настоящем документе, и/или других способах, которые описаны в данной области техники, например, He et al., Nat. Comm. 7, 12041,

15 2016; Kong et al., Nat. Comm. 7, 12040, 2016; He et al., Sci Adv. 4(11):eaau6769, 2018; He et al., bioRxiv, 2020.2008.2022.262634, 2020; WO2017/192434; WO2019/089817 и WO2019/241483.

[0087] Последовательности нескольких конкретных наночастиц,

экспонирующих шиповидные белки SARS-CoV-2 согласно настоящему

20 изобретению, представлены в качестве примера в SEQ ID NO:38-40. SEQ ID NO:38 представляет собой слитую последовательность, содержащую S2GDHR2 без лидерной последовательности (SEQ ID NO:33), который соединен с последовательностью наночастицы I3-01v9 (SEQ ID NO:23) за счет линкера (G₄S)₂. Указанный шиповидный белок, экспонируемый на наночастице,

25 дополнительно содержит на своем С-конце сцепляющий домен LD7 (SEQ ID NO:29) и эпитоп Т-клеток PADRE (SEQ ID NO:30). SEQ ID NO:39 представляет собой слитую последовательность, содержащую S2GDHR2 без лидерной последовательности (SEQ ID NO:33), который соединен с последовательностью наночастицы E2p (SEQ ID NO:24) за счет линкера G₄S. Указанный шиповидный

30 белок, экспонируемый на наночастице, дополнительно содержит на своем С-конце сцепляющий домен LD4 (SEQ ID NO:28) и эпитоп Т-клеток PADRE (SEQ ID NO:30). SEQ ID NO:40 представляет собой слитую последовательность,

содержащую S2GDHR2 без лидерной последовательности (SEQ ID NO:33), который соединен с последовательностью ферритина наночастицы (SEQ ID NO:25) за счет линкера G₄S. В дополнение к этим конкретно приведенным в качестве примера слитым конструкциям настоящее изобретение также

5 охватывает вакцины на основе наночастиц против SARS-CoV-2, которые содержат последовательность субъединицы, которая по существу идентична или представляет собой консервативно модифицированный вариант любой из указанных последовательностей вакцин на основе наночастиц, приведенных в качестве примера.

10 **[0088]** Последовательности 3 примерных вакцин на основе наночастиц против SARS-CoV-2 показаны в SEQ ID NO:38-40 ниже. В этих последовательностях линкеры GS (1) между шиповидным белком и последовательностью субъединицы наночастицы, (2) между последовательностью субъединицы наночастицы и сцепляющим доменом, и (3)
15 между сцепляющим доменом и эпитопом Т-клеток выделены жирным шрифтом, последовательность субъединицы наночастицы подчеркнута, введенный сайт рестрикции AS выделен курсивом и подчеркнут, последовательность сцепляющего домена выделена курсивом, и последовательность эпитопа Т-клеток подчеркнута и выделена жирным шрифтом.

20 **[0089]** Последовательность S2GDHR2-10GS-I3-01v9-LD7-PADRE (SEQ ID NO:38).
QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSL LIVNN
ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
25 LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
PIGINITRFQTL LALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENG
TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
EVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
TNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
30 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ

VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSGNVFQTRAGCLIGAEHVNNS
 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
 TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 5 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLA
 GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREG
 10 VFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
 FKASGGGGSGGGGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALAVFVGGVH
LIEITFTVPDADTVIKELSFLKELGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLD
EEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPOFVKAMK
GPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGITAEVAAKAAAFV
 15 EKIRGCTEGGGGSSPAVDIGDRLDELEKALEALSAEDGHDDVGQRLESLLRRWNS
RRADGSAKFVAAWTLKAAA

[0090] Последовательность вакцины на основе наночастиц S2GDHR2-5GS-
 E2p-LD4-PADRE (SEQ ID NO:39):

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
 20 IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNN
 ATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
 LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
 PIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRFTLLKYNENG
 TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
 25 EVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
 TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEYIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
 LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
 30 VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSGNVFQTRAGCLIGAEHVNNS
 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
 TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI

AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLA
 GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 5 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREG
 VFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
 FK4SGGGGSAAAKPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHVTLM
DEADVTKLV AHRKKFK AIAAEKG IKL TFLPYVVKALVSALREYPVLNTAIDDE
 10 TEEIIQKHYYNIGIAADTDRLGLLVPVIKHADRKP IFALAQEINELAEKARDGKLT
PGEMKGASCTITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPM
LALSLSFDHRMIDGATAQKALNHIKRLSDPELLLMGGGGSFSEEQKKALDLAF
YFDRRLTPEWRRYLSQRLGLNEEQIERWFRKEQQIGWSHPQFEKGS**AKFVAAW**
TLKAAA
 15 **[0091]** Последовательность вакцины на основе наночастиц S2GDHR2-5GS-
 ферритин (SEQ ID NO:40):
 QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHA
 IHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNN
 ATNVVIK VCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
 20 LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL
 PIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENG
 TITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG
 EVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNASFSSTFKCYGVSPTKLNDLCF
 TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
 25 GGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGV
 LTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
 VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNS
 YECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIP
 30 TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNK
 VTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDemiaQYTSALLA

GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIG
 KIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDG
 GEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREG
 5 VFVSNGTHWFTVQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDS
FK4SGGGGSDIIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHA
AEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNI
VDHAIKSKDHATFNFLOWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQY
VKGIAKSRKS

10

V. Полинуклеотиды и экспрессионные конструкции

[0092] Стабилизированные иммуногенные белки растворимого S-белка
 коронавируса и соответствующие композиции вакцины согласно настоящему
 изобретению, как правило, получают путем сначала создания экспрессионных
 15 конструкций (т.е. векторов экспрессии), которые содержат функционально
 связанные кодирующие последовательности различных структурных
 компонентов, описанных в настоящем документе. Соответственно, в некоторых
 связанных аспектах настоящего изобретения предложены по существу
 очищенные полинуклеотиды (ДНК или РНК), которые кодируют иммуногены
 20 или экспонируемые наночастицами иммуногены, описанные в настоящем
 документе. Некоторые полинуклеотиды согласно настоящему изобретению
 кодируют один из сконструированных иммуногенных полипептидов
 шиповидного белка, описанных в настоящем документе, например,
 стабилизированные иммуногены растворимого S-белка SARS-COV-2, показанные
 25 в SEQ ID NO:32-37. Некоторые полинуклеотиды согласно настоящему
 изобретению кодируют последовательность субъединицы одной из вакцин,
 размещенных на каркасах наночастиц, описанных в настоящей заявке, например,
 последовательности слитого белка, показанные в SEQ ID NO:38-40. Хотя
 экспрессированные иммуногенные полипептиды шиповидного белка согласно
 30 настоящему изобретению обычно не содержат N-концевой лидерной
 последовательности, некоторые из полинуклеотидных последовательностей
 согласно настоящему изобретению дополнительно кодируют лидерную

последовательность нативного шиповидного белка. Таким образом, например, полинуклеотиды, кодирующие сконструированные иммуногенные полипептиды шиповидного белка SARS-COV-2 (например, SEQ ID NO:33-37) или полипептидные последовательности, размещенные на каркасе наночастиц (например, SEQ ID NO:38-40), могут дополнительно кодировать нативную лидерную последовательность, показанную в SEQ ID NO:15, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

[0093] Согласно настоящему изобретению также предложены векторы экспрессии, которые несут такие полинуклеотиды (например, векторы на основе ЦМВ, приведенные в качестве примера в настоящем документе) и клетки-хозяева для продукции вакцинных иммуногенов (например, линии клеток HEK293F, ExpiCHO и CHO-S, приведенные в качестве примера в настоящем документе). Слитые полипептиды, кодируемые полинуклеотидами или экспрессируемые с векторов, также включены в настоящее изобретение. Как описано в настоящем документе, слитые с субъединицей наночастицы иммуногенные полипептиды растворимого S-белка будут подвергаться самосборке в вакцины на основе наночастиц, которые экспонируют иммуногенные полипептиды или белки на своей поверхности.

[0094] Полинуклеотиды и соответствующие векторы могут быть легко созданы с помощью стандартных методик молекулярной биологии или протоколов, приведенных в качестве примера в настоящем документе. Например, общие протоколы для клонирования, трансфекции, временной генной экспрессии и получения стабильных трансфицированных клеточных линий описаны в данной области техники, например, в источниках Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); и Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003). В последовательность полинуклеотида можно вводить мутации с помощью ПЦР, как описано, например, в источнике *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al.

(Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; and Eckert *et al.*, *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

[0095] Выбор конкретного вектора зависит от предполагаемого применения слитых полипептидов. Например, выбранный вектор должен быть способен
5 запускать экспрессию слитого полипептида в желаемом типе клеток, которые могут быть прокариотическими или эукариотическими. Многие векторы содержат последовательности, позволяющие как репликацию вектора в прокариотических клетках, так и экспрессию в эукариотических клетках функционально связанных последовательностей генов. Векторы, применимые
10 согласно настоящему изобретению, могут представлять собой автономно реплицирующиеся векторы, т.е. указанный вектор является экстрахромосомным, и его репликация не обязательно непосредственно связана с репликацией генома клетки-хозяина. Альтернативно, репликация вектора может быть связана с репликацией хромосомной ДНК хозяина, например, вектор может быть встроен в
15 хромосому клетки-хозяина, что достигается с помощью использования ретровирусных векторов и стабильно трансфицируемых клеточных линий. Векторы на основе вирусов и невирусные векторы экспрессии можно использовать для получения иммуногенов в клетке-хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают
20 плазмиды, эписомальные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., *Nat. Genet.* 15:345, 1997). Применимые вирусные векторы включают векторы на основе лентивирусов или других ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, цитомегаловируса, вирусов
25 герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барра НВР, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). см., Brent et al., *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

[0096] В зависимости от конкретного вектора, используемого для экспрессии
30 полипептида слияния, при практическом осуществлении изобретения могут применяться различные известные клетки или клеточные линии. Клетка-хозяин, которая может представлять собой любую клетку, в которую можно вводить

рекомбинантные векторы, содержащие слитые полипептиды согласно настоящему изобретению, где указанный вектор может запускать экспрессию указанного слитого полипептида, применима согласно настоящему изобретению.

Клетка-хозяин может быть прокариотической, такой как любое количество бактериальных штаммов, или может быть эукариотической, такой как клетки дрожжей или другие клетки грибов, насекомых или амфибий или млекопитающих, включая, например, клетки грызунов, обезьян или человека.

Клетки, экспрессирующие слитые полипептиды согласно настоящему изобретению, могут представлять собой первичные клеточные культуры или

установленную клеточную линию. Таким образом, помимо клеточных линий, приведенных в качестве примера в настоящем документе (например, клеток СНО), ряд других линий клеток-хозяев, хорошо известных в данной области техники, также можно применять при практическом осуществлении настоящего изобретения. Они включают, например, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, клетки Sf9, HEK293, AtT20, BV2 и N18, миеломные клеточные линии, трансформированные В-клетки и гибридомы.

[0097] Применение культур клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждается в целом, например, в источнике Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы, экспрессирующие

слитый полипептид, можно вводить в выбранные клетки-хозяева с помощью любого количества подходящих способов, известных специалисту в данной области техники. Для введения кодирующих слитый полипептид векторов в клетки млекопитающих используемый метод будет зависеть от вида вектора. В

случае плазмидных векторов ДНК, кодирующую последовательности слитого полипептида, можно вводить с помощью ряда методов трансфекции, включая, например, опосредованную липидами трансфекцию («липофекцию»), DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, электропорацию или преципитацию с помощью фосфата кальция. Указанные способы подробно описаны, например, в источнике Brent et al., выше. Реагенты для липофекции и способы, подходящие

для временной трансфекции широкого разнообразия трансформированных и нетрансформированных или первичных клеток являются широкодоступными, что делает липофекцию привлекательным способом введения конструкций в

эукариотические клетки и, в частности, клетки млекопитающих в культуре.

Например, доступны наборы LipofectAMINE™ (Life Technologies) или LipoTaxi™ (Stratagene). Другие компании, предлагающие реагенты и методы для липофекции включают Bio-Rad Laboratories, CLONTECH, Glen Research, Life Technologies, JBL Scientific, MBI Fermentas, PanVera, Promega, Quantum Biotechnologies, Sigma-Aldrich и Wako Chemicals USA.

[0098] Для долговременной продукции рекомбинантных полипептидов слияния с высоким выходом стабильная экспрессия является предпочтительной.

Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные оиджины репликации, клетки-хозяева можно трансформировать кодирующими слитый полипептид последовательностями, которые контролируются подходящими контрольными элементами экспрессии (например, промоторными, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективируемыми маркерами. Селективируемый

маркер в рекомбинантном векторе предоставляет устойчивость при селекции и позволяет стабильную интеграцию вектора в хромосомы клеток. Обычно используемые селективируемые маркеры включают нео, который предоставляет устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981); и hygro, который предоставляет устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene, 30: 147, 1984). С помощью подходящих способов селекции можно получать трансфицированные клетки, содержащие встроенные копии кодирующей слитый полипептид последовательности.

VI. Фармацевтические композиции и способы терапевтического применения

[0099] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции и соответствующие способы терапевтического применения иммуногенов коронавируса S-белка с измененным дизайном и композиций вакцины на основе наночастиц, описанных в настоящем документе. Согласно различным вариантам реализации фармацевтические композиции могут содержать сконструированные вирусные шиповидные белки или полипептиды RBD, иммуногены вирусного шиповидного белка, размещенные на каркасе наночастицы, а также полинуклеотидные последовательности или векторы,

кодирующие сконструированные иммуногены вирусного шиповидного белка или вакцины на основе наночастиц, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации иммуноген тримера растворимого S-белка для различных вирусов (например, SARS-COV-2) можно применять для

5 предотвращения и лечения соответствующих вирусных инфекций. Согласно другим различным вариантам реализации вакцины на основе наночастиц, содержащие различные вирусные или невирусные иммуногены, описанные в настоящем документе, можно применять для предотвращения или лечения соответствующих заболеваний, например, инфекций, вызванных различными

10 коронавирусами. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к применению иммуногенов SARS-COV-2 или вакцин для предотвращения или лечения инфекций SARS-COV-2 у субъектов-людей.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к

применению иммуногенов SARS-CoV или вакцин для предотвращения или

15 лечения инфекций SARS-CoV. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к применению иммуногенов MERS-CoV или вакцин для предотвращения или лечения инфекций MERS-CoV.

[00100] При практическом осуществлении различных терапевтических

способов согласно настоящему изобретению субъектам, нуждающимся в

20 предотвращении или лечении заболевания или состояния (например, инфекции SARS-COV-2), вводят соответствующие вакцины на основе наночастиц,

иммуногенный белок или полипептид или кодирующий полинуклеотид,

описанный в настоящем документе. Как правило, вакцина на основе наночастиц,

иммуногенный белок или кодирующий полинуклеотид, описанный в настоящем

25 документе, включен в фармацевтическую композицию. Фармацевтическая

композиция может представлять собой терапевтический состав или

профилактический состав. Как правило, композиция может дополнительно

включать один или более фармацевтически приемлемых наполнителей и

необязательно другие терапевтические ингредиенты (например, противовирусные

30 лекарственные средства). В композициях также можно применять различные

фармацевтически приемлемые добавки.

[00101] Таким образом, некоторые из фармацевтических композиций согласно изобретению представляют собой композиции вакцины. В случае вакцинных композиций могут быть дополнительно включены подходящие адъюванты.

Примеры подходящих адъювантов включают, например, гидроксид алюминия, лецитин, адъювант Фрейнда, MPLTM и IL-12. Согласно некоторым вариантам реализации композиции вакцины или иммуногены наночастиц, раскрытые в настоящем документе (например, композиция вакцины против SARS-COV-2), могут быть изготовлены в виде состава с контролируемым высвобождением или с замедленным высвобождением. Этого можно достичь в композиции, которая содержит полимер с медленным высвобождением, или с помощью микроинкапсулированной системы доставки или биоадгезивного геля.

Различные фармацевтические композиции можно приготовить в соответствии со стандартными процедурами, хорошо известными в данной области техники. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978); патенты США №№ 4652441 и 4917893; патенты США №№ 4677191 и 4728721; и патент США № 4675189.

[00102] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно с легкостью применять во множестве вариантов терапевтического или профилактического применения, например, для лечения инфекции SARS-COV-2 или вызова иммунного ответа на SARS-COV-2 у субъекта. Согласно различным вариантам реализации композиции вакцины можно применять для лечения или предотвращения инфекций, вызванных патогеном, из которого получен экспонируемый иммуногенный полипептид в вакцине на основе наночастиц.

Таким образом, композиции вакцины согласно настоящему изобретению можно применять в различных клинических условиях для лечения или предотвращения инфекций, вызванных различными вирусами. В качестве примера, композицию вакцины на основе наночастиц против SARS-COV-2 можно вводить субъекту для индукции иммунного ответа на SARS-COV-2, например, чтобы индуцировать продукцию нейтрализующих антител против вируса широкого спектра действия. В случае субъектов, подверженных риску развития инфекции SARS-COV-2, композицию вакцины согласно настоящему изобретению можно вводить для

обеспечения профилактической защиты против вирусной инфекции. Способы терапевтического и профилактического применения вакцин, полученных на основе других иммуногенов, описанных в настоящей заявке, можно выполнять подобным образом. В зависимости от конкретного субъекта и условий

5 фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъектам с помощью различных способов введения, известных обычному специалисту в данной области техники, например, внутримышечного, подкожного, внутривенного, интраартериального, интраартикулярного, внутрибрюшинного или парентерального путей введения.

10 **[00103]** В целом, фармацевтическую композицию вводят субъекту, который нуждается в таком лечении, в течение времени и в условиях, достаточных для предотвращения, ингибирования и/или облегчения выбранного заболевания или состояния либо одного или более его симптомов. Согласно различным вариантам реализации терапевтические способы согласно настоящему изобретению

15 относятся к способам блокирования проникновения коронавируса (например, SARS-CoV, SARS-CoV-2 или MERS-CoV) в клетку-хозяина, например, клетку-хозяина человека, способам предотвращения связывания S-белка коронавируса с рецептором хозяина и способам лечения острого респираторного дистресса, который часто связан с коронавирусными инфекциями. Согласно некоторым

20 вариантам реализации терапевтические способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации с другими известными терапевтическими агентами и/или способами, пригодными для лечения или предотвращения коронавирусных инфекций. Известные терапевтические агенты и/или способы включают, например, аналог нуклеазы или ингибитор протеазы

25 (например, ремдесивир), моноклональные антитела, направленные против одного или более коронавирусов, иммуносупрессор или противовоспалительный агент (например, сарилумаб или тоцилизумаб), ингибиторы АПФ, сосудорасширяющие средства или любую их комбинацию.

[00104] Для способов терапевтического применения композиции должны

30 содержать терапевтически эффективное количество иммуногена наночастиц, описанного в настоящем документе. Для способов профилактического применения композиции должны содержать профилактически эффективное

количество иммуногена наночастиц, описанного в настоящем документе.

Соответствующее количество иммуногена можно определить в зависимости от конкретного заболевания или состояния, лечение или предотвращение которого проводят, тяжести, возраста субъекта и других индивидуальных характеристик конкретного субъекта (например, общего состояния здоровья субъекта и устойчивости иммунной системы субъекта). При определении эффективных доз дополнительно руководствуются исследованиями на моделях на животных с последующими клиническими исследованиями на человеке и руководствуются протоколами введения, которые в значительной степени снижают возникновение или тяжесть симптомов заболевания- или состояний-мишеней у субъекта.

[00105] Для вариантов профилактического применения иммуногенную композицию вводят до возникновения какого-либо симптома, например, до возникновения инфекции. Профилактическое введение иммуногенных композиций служит для предотвращения или облегчения любой последующей инфекции. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации субъект, подлежащий лечению, представляет собой субъекта, который страдает или имеет риск развития инфекции (например, инфекции SARS-COV-2), например, в связи с воздействием или возможностью воздействия вируса (например, SARS-COV-2). После введения терапевтически эффективного количества описанных терапевтических композиций субъект находится под наблюдением на предмет развития инфекции (например, инфекции SARS-COV-2), симптомов, связанных с инфекцией (например, инфекцией SARS-COV-2) или и того, и другого.

[00106] В способах терапевтического применения иммуногенная композиция обеспечивается во время или после начала проявления симптома заболевания или инфекции, например, после развития симптома инфекции (например, инфекции SARS-COV-2) или после диагностированной инфекции. Таким образом, иммуногенная композиция может быть обеспечена до ожидаемого воздействия вируса, чтобы ослабить ожидаемую тяжесть, длительность или степень инфекции и/или связанные симптомы заболевания, после воздействия или предполагаемого воздействия вируса или после фактического начала инфекции.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно комбинировать с другими агентами, которые известны в данной области техники

для лечения или предотвращения инфекций, вызванных соответствующим патогеном (например, инфекции SARS-COV-2).

[00107] Композиции вакцины на основе наночастиц, содержащие новые структурные компоненты, описанные в настоящем изобретении (например, вакцина против SARS-COV-2), или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены в виде компонентов набора. Такой набор необязательно включает дополнительные компоненты, включая упаковку, инструкции и различные другие реагенты, такие как буферы, субстраты, антитела или лиганды, такие как контрольные антитела или лиганды, и реагенты для детектирования. Необязательно в указанных наборах может быть дополнительно предложена инструкция по применению.

ПРИМЕРЫ

[00108] Следующие примеры предложены для иллюстрации, а не ограничения настоящего изобретения.

Пример 1 Стабилизация, получение и очистка S-антигена

[00109] В этом примере описаны стабильные и растворимые тримеры S-белка коронавируса с измененным дизайном:

20 I. SARS-CoV:

[00110] Последовательность S-белка SARS-CoV получали из GenBank с идентификационным номером NP_828851. Нумерация основана на определении UniProt с UniPro ID P59594. Конструкция растворимого S-белка определена как M1-Q1190. Q1190 находится непосредственно перед прогнозируемой трансмембранной областью, которая начинается с мотива ¹¹⁹¹YIK¹¹⁹³. Конструкция усеченного растворимого S-белка определена как M1-K1131, которая не содержит HR2. Делеция HR2 разрушит кор слияния HR1/HR2 и стабилизирует структуру S-белка перед слиянием. Конструкция S-белка может быть дополнительно усечена в Y1120 с мотивом «GNS» из 3 остатков (из MERS-CoV S), добавленным в Y1120. Эта модификация значительно увеличит выход белка при экспонировании на наночастицах.

- [00111]** Конструкции нерасщепленного, оптимизированного в состоянии перед слиянием (UFO) S-белка могут быть получены путем (а) добавления мутации R667G и двойной мутации K968P/V969P (или K968G/V969G) между HR1 и центральной спиралью (CH). В то время как мутация R667G направлена на удаление сайта расщепления S1/, было показано, что двойная мутация K968P/V969P стабилизирует структуру S-белка перед слиянием. Вместо того чтобы укреплять HR1-поворот-CH, двойная мутация K968G/V969G направлена на удаление любого напряжения в области поворота и, как результат, на стабилизацию структуры S-белка перед слиянием.
- [00112]** Конструкции UFO S-белка, описанные выше, могут быть дополнительно стабилизированы путем введения мутационной замены пролином (S924P, T925P или A926P), мутационной замены глицином (S924G, T925G или A926G) или их комбинаций в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Функция этих мутаций заключается в разрушении кора слияния с шестиспиральным пучком и дестабилизации S-белка после слияния. Другие мутации, такие как вставка одного или двух остатков (например, G или GS) в область S924-A926 для разрушения спирального профиля, также могут дестабилизировать S-белок после слияния и предотвращать конформационное изменение.
- [00113]** Мотивы тримеризации, такие как фолдон фибритина T4 (PDB ID: 4NCV) и вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), могут быть дополнительно добавлены к С-концу конструкции S-белка с измененным дизайном, описанной выше, с коротким линкером GS между ними для стабилизации тримера. Кроме того, His6-метка может быть добавлена к С-концу мотива тримеризации для облегчения очистки белка с помощью колонки с никелем.
- [00114]** С-конец конструкций UFO S-белка SARS-CoV с измененным дизайном может быть слит с N-концом образующей наночастицы субъединицы (24-членный ферритин и два 60-членных комплекса, E2p и I3-01) таким образом, что слитая конструкция, при экспрессии в соответствующих клеточных линиях, может самособираться в наночастицы с тримерами S-белка перед слиянием, экспонируемыми на поверхности наночастицы.

[00115] Последовательность растворимого S-белка SARS-CoV (SEQ ID NO:1):
MFIFLLFLTTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYL
TQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFGNPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMN
NKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQTHTMIFDNAFNCTFEY
5 ISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLK
PIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTT
DAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPBGDVVRFPNITNLCPFGEV
FNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLNSTFFSTFKCYGVSATKLNDLCFSN
VYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPPDDFMGCVLAWNTRNIDATST
10 GNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTPALNCYWPLNDYGFYTT
TGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNCVNFNFNGLTGTGVLTP
SSKRFQPFQQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSVITPGTNASSEVA
VLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAETHVDTSYEC
DIPGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITT
15 EVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQDR
NTREVFQVQKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLAD
AGFMKQYGECLGDINARDLCAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTAT
AGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQE
SLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAE
20 VQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCG
KGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFV
NGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKEELD
KYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYE
Q

25 **[00116]** Последовательность растворимого S-белка SARS-CoV без N-концевой
лидерной последовательности (SEQ ID NO:7): остатки 14-1190 из SEQ ID NO:1.

[00117] Лидерная последовательность (SEQ ID NO:8): MFIFLLFLTTLTSG
(остатки 1-13 из SEQ ID NO:1).

30 **[00118]** Последовательность HR2 (SEQ ID NO:9): остатки 1132-1190 из SEQ
ID NO:1
EELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELG
KYEQ

[00119] Дополнительно усеченная С-концевая последовательность (SEQ ID NO:10):

DPLQPELDSFK (остатки 1121-1131 из SEQ ID NO:1).

5 II. MERS-CoV:

[00120] Последовательность S-белка MERS-CoV получали из GenBank с идентификационным номером JX869059.2. Нумерация аминокислот основана на определении UniProt с UniPro ID R9UQ53.

10 **[00121]** Конструкция растворимого S-белка определена как M1-Y1291. Y1291 находится непосредственно перед прогнозируемой трансмембранной областью, которая начинается с мотива ¹²⁹²YNK¹²⁹⁴. Конструкция усеченного растворимого S-белка определена как M1-S1226, которая не содержит HR2. Делеция HR2 разрушит кор слияния HR1/HR2 и стабилизирует структуру S-белка перед слиянием.

15 **[00122]** Конструкции нерасщепленного, оптимизированного в состоянии перед слиянием (UFO) S-белка могут быть получены путем добавления двойной мутации R748A/R751G и двойной мутации V1060P/L1061P (или V1060G/L1061G). В то время как двойная мутация R748A/R751G направлена на удаление сайта расщепления S1/S2, было показано, что двойная мутация
20 V1060P/L1061P стабилизирует структуру S-белка перед слиянием. Вместо того чтобы укреплять HR1-поворот-CH, двойная мутация V1060G/L1061G направлена на удаление любого напряжения в области поворота и, как результат, на стабилизацию структуры S-белка перед слиянием.

[00123] Конструкции UFO S-белка, описанные выше, могут быть
25 дополнительно стабилизированы путем введения мутационной замены пролином (T1013P, T1014P или T1015P), мутационной замены глицином (T1013G, T1014G или T1015G) или их комбинаций в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Эти мутации будут разрушать кор слияния с шестиспиральным пучком и дестабилизировать S-белок после слияния. Другие
30 мутации, такие как вставка одного или двух остатков (например, G или GS) в область T1013-T1015 для разрушения спирального профиля, также будут дестабилизировать S-белок после слияния и предотвращать конформационное изменение.

[00124] Мотивы тримеризации, такие как фолдон фибритина T4 (PDB ID: 4NCV) и вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), могут быть добавлены к С-концу конструкций UFO S-белка с измененным дизайном, описанных выше, с коротким линкером GS между ними для стабилизации тримера. His6-метка может
5 быть добавлена к С-концу мотива тримеризации для облегчения очистки белка с помощью колонки с никелем.

[00125] С-конец конструкций UFO S-белка MERS-CoV с измененным дизайном может быть слит с N-концом образующей наночастицы субъединицы таким образом, что слитая конструкция, при экспрессии в соответствующих
10 клеточных линиях, может самособираться в наночастицы с тримерами S-белка перед слиянием, экспонируемыми на поверхности наночастицы.

[00126] Растворимый S-белок MERS-CoV (SEQ ID NO:2):

MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFDDKTWPRPIDVSKAD
GIIYPQGRITYSNITITYQGLFPYQGDHGDYVYSAGHATGTTTPQKLFVANYSQ
15 DVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFSDGKM
GRFFNHTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCS
DGNYNRNASLNSFKEYFNLRNCTFMYTYNITEDEILEWFGITQTAQGVHLFSSR
YVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSIRSIQSDRKAWAAFYVYKLQPLTF
LLDFSVDGYIRRAIDCGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSVSSFEAKPSGSVVEQ
20 AEGVECDFSPLLSGTPPVYNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPA
IASNCYSSLILDYFSYPLSMKSDLSVSSAGPISQFNYKQSFNPTCLILATVPHNL
TTITKPLKYSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYYR
KQLSPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMGGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDT
KIASQLGNCVEYSLYGVSGRGVFQNCTAVGVRRQRFVYDAYQNLVGYYSDD
25 GNYCYCLRACVSPVSVIYDKETKTHATLFGSVACEHISSTMSQYSRSTRSMLKR
RDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPSTLTPRSVRSVP
GEMRLASIAFNHPIQVDQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTTIQKVTVDCKQY
VCNGFQKCEQLLREYGQFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLFASVKSSQSSPIIP
GFGGDFNLTLLEPVSISTGSRARSASIEDLLFDKVTIADPGYMQGYDDCMQQGP
30 ASARDLICAQYVAGYKVLPLMDVNMEAAYTSSLLGSIAGVGWTAGLSSFAAI
PFAQSIFYRLNGVGITQQVLSNQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQ
DAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTL

NAFVAQQLVRSESAALSAQLAKDKVNECVKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVVNA
 PNGLYFMHVGYYPSNHIEVV SAYGLCDAANPTNCIAPVNGYFIKTNNTRIVDE
 WSYTGSSFYAPEPITSLNTKYVAPQVTYQNISTNLPPLLGNSTGIDFQDELDEF
 FKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYTY

5 **[00127]** Последовательность растворимого S-белка MERS-CoV без N-концевой лидерной последовательности (SEQ ID NO:11): остатки 18-1291 из SEQ ID NO:2.

[00128] Лидерная последовательность (SEQ ID NO:12): MIHSVFLLMFLLTPTES (остатки 1-17 из SEQ ID NO:2).

[00129] Последовательность HR2 (SEQ ID NO:13): остатки 1227-1291 из SEQ ID NO:2

TGIDFQDELDEFFKNVSTSIPNFGSLTQINTTLLDLTYEMLSLQQVVKALNESYIDLKELGNYTY

III. SARS-CoV-2:

15 **[00130]** Последовательность S-белка SARS-CoV-2 получали из GenBank с идентификационным номером MN908947.3. Нумерация аминокислот основана на крио-ЭМ модели с PDB ID 6VSB.

[00131] Конструкция растворимого S-белка определена как M1-Q1208. Q1208 находится непосредственно перед прогнозируемой трансмембранной областью, которая начинается с мотива ¹²⁰⁹YIK¹²¹¹. Конструкция усеченного растворимого S-белка определена как M1-K1149, которая не содержит HR2. Делеция HR2 разрушит кор слияния HR1/HR2 и стабилизирует структуру S-белка перед слиянием. Конструкция S-белка может быть дополнительно усечена в Y1138 с мотивом «GNS» из 3 остатков (из MERS-CoV S), добавленным в Y1138. Эта модификация значительно увеличит выход белка при экспонировании на наночастицах.

[00132] Конструкция нерасщепленного, оптимизированного в состоянии перед слиянием (UFO) растворимого S-белка определяется как M1-Q1208 с модифицированным сайтом расщепления S1/S2 ⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷ (SEQ ID NO:18) и двойной мутацией K986P/V987P (или K986G/V987G). SARS-CoV-2 имеет вставку 4 аминокислот перед сайтом расщепления S1/S2, ⁶⁸¹PRRA⁶⁸⁴, которая повысит эффективность расщепления. Модификация ⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷ (SEQ ID NO:18)

направлена на удаление сайта расщепления S1/S2, и было показано, что двойная мутация K986P/V987P стабилизирует структуру S-белка перед слиянием. Вместо того чтобы укреплять HR1-поворот-CH, двойная мутация K986G/V987G направлена на удаление любого напряжения в области поворота и, как результат, на стабилизацию структуры S-белка перед слиянием.

[00133] Конструкции UFO S-белка SARS-CoV-2 в (b) могут быть дополнительно стабилизированы путем введения мутационной замены пролином (A942P, S943P и A944P), мутационной замены глицином (A942G, S943G и A944G) или их комбинаций в область HR1, которая взаимодействует с HR2 с образованием кора слияния. Эти мутации будут разрушать кор слияния с шестиспиральным пучком и дестабилизировать S-белок после слияния. Другие мутации, такие как вставка одного или двух остатков (например, G или GS) в область A942-A944 для разрушения спирального профиля, также будут дестабилизировать S-белок после слияния и предотвращать конформационное изменение.

[00134] Мотивы тримеризации, такие как фолдон фибритина T4 (PDB ID: 4NCV) и вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), могут быть добавлены к С-концу конструкции S-белка с измененным дизайном в (b) и (c) с коротким линкером GS между ними для стабилизации тримера. His6-метка может быть добавлена к С-концу мотива тримеризации для облегчения очистки белка с помощью колонки с никелем.

[00135] С-конец конструкции UFO S-белка SARS-CoV-2 с измененным дизайном, описанной выше, может быть слит с N-концом образующей наночастицу субъединицы таким образом, что слитая конструкция, при экспрессии в соответствующих клеточных линиях, может самособираться в наночастицы с тримерами S-белка перед слиянием, экспонируемыми на поверхности наночастицы.

[00136] Растворимый S-белок SARS-CoV-2 (SEQ ID NO:3):
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDL
FLPFFSNVTWFHAIHVS GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTKSNIRGWIFGTT
LDSKTQSLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSS
ANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDL

PQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYL
 QPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTES
 IVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKC
 YGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 5 VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCV
 NFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFEGG
 VSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRA
 GCLIGAEHVNNSECDIPGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAE
 10 NSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
 FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPS
 KRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
 MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQK
 LIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS
 15 VLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM
 SECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAIC
 HDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNT
 VYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVA
 KNLNESLIDLQELGKYEQ

20 **[00137]** Последовательность растворимого S-белка SARS-CoV-2 без N-
 концевой лидерной последовательности (SEQ ID NO:14): остатки 14-1208 из SEQ
 ID NO:3.

[00138] Лидерная последовательность (SEQ ID NO:15): MFVFLVLLPLVSS
 (остатки 1-13 из SEQ ID NO:3).

25 **[00139]** Последовательность HR2 (SEQ ID NO:9): остатки 1150-1208 из SEQ
 ID NO:3
 EELDKYFKNHTSPDVLDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNL NESLIDLQELG
 KYEQ

30 **[00140]** Дополнительно усеченная C-концевая последовательность (SEQ ID
 NO:10):
 DPLQPELDSFK (остатки 1121-1131 из SEQ ID NO:3).

Пример 2 Разработанные домены RBD коронавируса

I. Вакцины на основе RBD SARS-CoV:

[00141] Последовательность S-белка SARS-CoV и нумерация аминокислот указаны выше. RBD SARS-CoV, используемый в конструкции вакцины на основе RBD, определяется как P317-D518 (см. SEQ ID NO:4). В частности, мотив тримеризации, вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), может быть добавлен к С-концу RBD SARS-CoV с коротким линкером 5GS между ними для стабилизации RBD в тримерной конформации. His6-метка может быть добавлена к С-концу мотива тримеризации с помощью линкера 1GS для облегчения очистки.

10 **[00142]** SpyTag и SpyCatcher могут быть присоединены к RBD SARS-CoV и субъединице наночастицы в различных комбинациях для облегчения мультивалентного экспонирования RBD на наночастице. Например, если С-конец RBD слит с N-концом SpyTag с использованием линкера 5GS, С-конец SpyCatcher может быть слит с N-концом субъединицы наночастицы с использованием линкера 5GS для создания пары. SpyTag и SpyCatcher можно поменять местами в этих двух конструкциях для создания другой пары. SpyTag или SpyCatcher также могут быть слиты с N-концом RBD с использованием линкера 5GS. При введении и экспрессии двух конструкций в клетках-хозяевах рекомбинантный вакцинный белок будет образован посредством связывания между мотивами SpyTag и SpyCatcher.

[00143] RBD SARS-CoV (SEQ ID NO:4)

PNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVS
ATKLNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLA
WNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTPPALNCY
25 WPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVLSELLNAPATVCGPKLSTD

[00144] SpyTag: VPTIVMVDAYKRYK (SEQ ID NO:16).

[00145] SpyCatcher: SEQ ID NO:17

AMVTTLSEGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEDEGRELAGATMELRDSSG
KTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNG
30 EATKGAHTAS

II. Вакцины на основе RBD MERS-CoV:

[00146] Последовательность S-белка MERS-CoV и нумерация аминокислот указаны выше. RBD MERS-CoV, используемый в конструкции вакцины на основе RBD, определяется как E382-K587 (см. SEQ ID NO:5). Мотив тримеризации, вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), может быть

5 добавлен к С-концу RBD MERS-CoV с коротким линкером 5GS между ними для стабилизации RBD в тримерной конформации. His6-метка может быть добавлена к С-концу мотива тримеризации с помощью линкера 1GS для облегчения очистки.

[00147] SpyTag и SpyCatcher могут быть присоединены к RBD MERS-CoV и

10 субъединице наночастицы в различных комбинациях для облегчения мультивалентного экспонирования RBD на наночастицах. Например, если С-конец RBD слит с N-концом SpyTag с использованием линкера 5GS, С-конец SpyCatcher может быть слит с N-концом субъединицы наночастицы с использованием линкера 5GS для создания пары. SpyTag и SpyCatcher можно

15 поменять местами в этих двух конструкциях для создания другой пары. SpyTag или SpyCatcher также могут быть слиты с N-концом RBD с использованием линкера 5GS. При введении и экспрессии двух конструкций в клетках-хозяевах рекомбинантный вакцинный белок будет образован посредством связывания между мотивами SpyTag и SpyCatcher.

20 **[00148]** RBD MERS-CoV (SEQ ID NO:5)

ECDFSPLLSGTPPQVYNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASN
CYSSLILDYFSYPLSMKSDLSVSSAGPISQFNKQSFNPTCLILATVPHNLTTIT
KPLKYSYINKCSRLLSDDRTEVPQLVNANQYSPCVSIVPSTVWEDGDYRKQL
SPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMFGITVQYGTDTNSVCPK

25 **[00149]** SpyTag: VPTIVMVDAYKRYK (SEQ ID NO:16).

[00150] SpyCatcher: SEQ ID NO:17:

AMVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEDGRELAGATMELRDSSG
KTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNG
EATKGDAHTAS

30

III. Вакцины на основе RBD SARS-CoV-2:

[00151] Последовательность S-белка SARS-CoV-2 и нумерация аминокислот указаны выше. RBD SARS-CoV-2, используемый в конструкции вакцины на основе RBD, определяется как P330-N532 (см. SEQ ID NO:6). Мотив

тримеризации, вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0), может быть

5 добавлен к С-концу RBD SARS-CoV-2 с коротким линкером 5GS между ними для стабилизации RBD в тримерной конформации. His6-метка может быть добавлена к С-концу мотива тримеризации с помощью линкера 1GS для облегчения очистки.

[00152] SpyTag и SpyCatcher могут быть присоединены к RBD SARS-CoV-2 и

10 субъединице наночастицы в различных комбинациях для облегчения мультивалентного экспонирования RBD на наночастицах. Например, если С-конец RBD слит с N-концом SpyTag с использованием линкера 5GS, С-конец SpyCatcher может быть слит с N-концом субъединицы наночастицы с использованием линкера 5GS для создания пары. SpyTag и SpyCatcher можно
15 поменять местами в этих двух конструкциях для создания другой пары. SpyTag или SpyCatcher также могут быть слиты с N-концом RBD с использованием линкера 5GS. При введении и экспрессии двух конструкций в клетках-хозяевах рекомбинантный вакцинный белок будет образован посредством связывания между мотивами SpyTag и SpyCatcher.

20 **[00153]** RBD SARS-CoV-2 (SEQ ID NO:6):

PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVS
PTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAW
NSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYF
PLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTN

25 **[00154]** SpyTag: VPTIVMVDAYKRYK (SEQ ID NO:16).

[00155] SpyCatcher: SEQ ID NO:17:

AMVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEDGRELAGATMELRDSSG
KTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNG
EATKGDAHTAS

30

Пример 3 Получение и очистка тримеров S-белка и доменов RBD

[00156] Линия клеток: Все конструкции экспрессировали в клетках HEK293 F и клетках ExpiCHO, при этом ExpiCHO показали значительно более высокий выход.

5 [00157] Очистка: После временной экспрессии антигена S-белка очищали из супернатанта с использованием трех способов, включая колонку с His6-меткой/никелем и колонку с антиген-специфичными антителами. Колонки с антителами S230 и CR3022 можно применять для очистки антигенов S-белка и RBD SARS-CoV и наночастиц. Колонку с антителом MCA1 можно применять для
10 очистки антигенов S-белка и RBD MERS-CoV и наночастиц; Колонку с антителом CR3022 можно применять для очистки антигенов S-белка и RBD SARS-CoV-2 и наночастиц.

Пример 4 Рациональная конструкция размещенного на каркасе тримера RBD и RBD-презентирующих SApNP

15 [00158] Мы предположили, что RBD, присоединенный к тримерному каркасу, может имитировать конформацию шиповидного белка «RBD-вверх» и вызывать НАТ для блокирования связывания АПФ-2. Чтобы протестировать эту возможность, мы разработали слитую конструкцию, содержащую RBD SARS-CoV-1/2, короткий 5-аминокислотный линкер G₄S (с сайтом рестрикции из 2
20 аминокислот) и тримерный вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0). Структурное моделирование показало, что три закрепленных RBD образуют треугольник 92 Å (измеренный для L492), который на 14 и 18 Å шире, чем шиповидный белок «два-RBD-вверх» SARS-CoV-1 (PDB: 6CRX, измеренный для L478) и шиповидный белок «все-RBD-вверх» MERS-CoV (PDB: 5X59,
25 измеренный для L506), соответственно, что позволяет НАТ получить доступ к каждому RBD. Затем мы разработали колонку для иммуноаффинной хроматографии (IAC), чтобы облегчить очистку вакцины без меток. Ранее колонки для IAC с НАТ использовали для очистки тримеров Env ВИЧ-1/НЧ, коров E2 вируса гепатита С (ВГС)/НЧ и тримеров GP вируса Эбола (EBOV)/НЧ.
30 Сообщалось, что НАТ против SARS-CoV-1, CR3022, может связывать RBD SARS-CoV-2 (Tian et al., Emerg. Microbes Infect. 9, 382-385, 2020). Структура SARS-CoV-2 RBD/CR3022 выявила эпитоп, общий для двух SARS-CoV, и

указывала на «дыхательное движение» (breathing motion) шиповидного белка, которое обеспечивает связывание CR3022 с RBD. В данном случае мы исследовали полезность CR3022 в колонках для IAC. Конструкции RBD-5GS-1TD0 SARS-CoV-1/2 временно экспрессировали в 100 мл клеток ExpiCHO и

5 очищали на колонке с антителом CR3022 перед эксклюзионной хроматографией (ЭХ) с использованием колонки Superdex 200 10/300 GL. В то время как конструкция RBD SARS-CoV-1 показала пики агрегатов (8,6 мл) и пики тримера (12,7 мл) в профиле ЭХ, конструкция RBD SARS-CoV-2 привела к одному пику тримера в 12,8 мл. При электрофорезе в полиакриламидном геле с

10 додецилсульфатом натрия (электрофорез в ДСН-ПААГ) наблюдали полосу мономера ~37 кДа и полосу тримера ~100 кДа в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, соответственно. Антигенность оценивали для двух размещенных на каркасе тримеров RBD в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) после очистки CR3022/ЭХ. RBD-

15 специфичные НАТ, нацеленные на SARS-CoV-1 (CR3022, m396, 80R и S230) и SARS-CoV-2 (B38, CB6, S309 от выжившего после SARS, и P2B-2F6), тестировали в ИФА. В целом, для двух тримеров RBD, связывающихся с их соответствующими НАТ, наблюдали сходные значения полумаксимальной

20 эффективной концентрации (EC_{50}). Тример RBD SARS-CoV-1 показал большую аффинность связывания с CR3002, чем его аналог SARS-CoV-2, с 1,3-кратной разницей в значении EC_{50} . Из всех НАТ против SARS-CoV-2 B38 дало значение EC_{50} , сходное с таковым для CR3022. Кинетику связывания антител измеряли с помощью интерферометрии биослоя (BLI). В целом, все тестируемые антитела проявили высокую скорость прямой реакции, но с видимыми различиями в их

25 скорости обратной реакции. Например, B38 показало более высокую скорость диссоциации, чем другие НАТ против SARS-CoV-2, в то время как CR3022, антитело, используемое для очистки белков RBD SARS-CoV-1/2, проявило сопоставимые кинетические профили.

[00159] Затем мы предположили, что система SpyTag/SpyCatcher (или просто

30 SPY) может быть использована для конъюгирования RBD с SApNP для создания мультивалентных вакцин на основе RBD, способных вызывать более мощный ответ НАТ. 13-аминокислотный SpyTag спонтанно реагирует с белком SpyCatcher

с образованием необратимой изопептидной связи. Систему SPY использовали для присоединения антигенов к SApNP и VLP. В данном случае SpyTag сливали с C-концом RBD, в то время как SpyCatcher сливали с N-концом субъединицы SApNP, оба с 5-аминокислотным линкером G₄S. Эту конструкцию сначала тестировали для FR. Мы сравнивали две стратегии получения – совместную экспрессию RBD-5GS-SpyTag и SpyCatcher-5GS-FR в сравнении со смесью супернатантов после отдельной экспрессии – и выполняли очистку на колонке с CR3022. Белок, полученный в результате временной трансфекции в 50 мл клеток ExpiCHO, анализировали методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. Обе стратегии получения дали пик (12 мл), соответствующий SApNP. В то время как конструкция SARS-CoV-2 заметно превосходила аналогичную конструкцию SARS-CoV-1 по выходу частиц (0,6-1,0 мг по сравнению с 0,3-0,5 мг после CR3022/ЭХ), смесь супернатантов, как представляется, превосходила коэкспрессию. Тем не менее, результаты свидетельствуют о том, что обе стратегии можно применять для получения RBD-конъюгированных SApNP в клетках яичника китайского хомяка, совместимых с Надлежащей производственной практикой (GMP). Антигенность оценивали для ЭХ-очищенных RBD-5GS-SPY-5GS-FR SApNP. В ИФА RBD-презентирующие SApNP показали незначительно улучшенное связывание МАТ, о чем свидетельствуют более низкие значения EC₅₀. В BLI наблюдали более выраженный эффект мультивалентного экспонирования на антигенность, показывающий заметно повышенные сигналы связывания и вышедшую на плато диссоциацию.

[00160] Структурную целостность различных RBD SApNP анализировали методом ЭМ с негативным окрашиванием. В случае SARS-CoV-1 для сравнения включали конструкцию RBD-10GS-FR, которая продуцировала очень мало SApNP. Напротив, конструкция RBD-5GS-SPY-5GS-FR продуцировала SApNP с видимыми поверхностными структурами. В случае SARS-CoV-2 очищенные RBD-5GS-SPY-5GS-FR SApNP, независимо от стратегии получения, показали морфологию, соответствующую хорошо сформированным наночастицам. Придерживаясь сходной стратегии, RBD SARS-CoV-1/2 также присоединяли к

многослойным I3-01v9 SApNP (He et al., *bioRxiv*, 2020.2008.2022.262634, 2020).
Несмотря на незначительный выход, при ЭМ наблюдали крупные SApNP.

[00161] Подытоживая, мы демонстрируем полезность системы SPY для

быстрой разработки вакцин SApNP на основе RBD. По сравнению с

- 5 двухкомпонентными RBD SApNP предложенные в настоящем документе SPY-
связанные RBD SApNP могут быть более предпочтительными с точки зрения
стабильности и технологичности изготовления.

Пример 5 Рациональная конструкция шиповидного белка перед слиянием
10 посредством минимизации метастабильности

[00162] Крайне важно понять метастабильность шиповидного белка SARS-

CoV-2 и на основании этого разработать оптимальный шиповидный белок в
качестве вакцинного антигена. Сначала мы создали конструкции

нерасщепленного эктодомена шиповидного белка с His-меткой (S_{ECTO}) для SARS-

- 15 CoV-1/2, которые обе содержали мутацию 2P и мотив тримеризации (1TD0),
слитый с С-концом с помощью линкера G₄S. Две конструкции временно
экспрессировали в 50 мл клеток ExpiCHO с последующей очисткой на колонке с
никелем или колонке с CR3022. Белок S2P_{ECTO}-5GS-1TD0-His₆ характеризовали
методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. После колонки с никелем обе

- 20 конструкции S2P_{ECTO} показали пик тримера (~12 мл) с плечами слева и справа,
что указывает на агрегатные и димерные/мономерные соединения,
соответственно. Очистка с CR3022 привела к постоянному пику тримера и
меньшему количеству димерных/мономерных соединений. Затем мы

- 25 протестировали пару конструкций S_{ECTO}, содержащих двойную мутационную
замену глицином (V1060G/L1061G, называемую 2G). Мутация 2G оказала
незначительное влияние на шиповидный белок SARS-CoV-1, но привела к
аномальному профилю ЭХ и не показала выхода для шиповидного белка SARS-
CoV-2 после очистки на колонках с никелем и с CR3022, соответственно.

- Наконец, мы протестировали пару вариантов S2G без стебля HR2 (E1150-Q1208),
30 называемых S2GΔHR2. Делеция стебля HR2 восстановила пик тримера SARS-
CoV-2 и уменьшила количество агрегатов для обоих SARS-CoV, как показано на
профилях ЭХ после очистки с CR3022.

[00163] Мы предположили, что HR2 может быть ключевой детерминантой метастабильности шиповидного белка SARS-CoV. Возможно, что

взаимодействия между HR1 и HR2 двух соседних шиповидных белков могут способствовать переходу от состояния до слияния к состоянию после слияния в

5 дополнение к связыванию АПФ-2 и диссоциации S1. Учитывая обширные мутации в HR1 (в общей сложности 9) по сравнению с SARS-CoV-1, мы попытались исследовать роль HR1 в метастабильности шиповидного белка SARS-CoV-2, используя две конструкции шиповидного белка с заменой HR1. Интересно отметить, что, хотя замена HR1 оказалась неэффективной, делеция
10 стебля HR2 снова восстановила пик тримера. Таким образом, S2GΔHR2 обеспечивает общую конструкцию шиповидного белка для SARS-CoV-1/2 и, возможно, других CoV. Четыре отдельных цикла получения S2GΔHR2-5GS-1TD0 SARS-CoV-2 в 300 мл клеток EpxiCHO привели к почти идентичным профилям ЭХ с выходом тримера 0,8-1,0 мг. Голубой нативный электрофорез в
15 полиакриламидном геле (BN-PAGE) подтвердил чистоту шиповидного белка S2GΔHR2 во фракциях ЭХ. Антигенность оценивали для свежеполученных шиповидных белков S2P_{ЕСТО} и S2GΔHR2 SARS-CoV-2. В ИФА шиповидный белок S2GΔHR2 постоянно показывал более высокую аффинность в отношении пяти типичных МАТ по сравнению с шиповидным белком S2P_{ЕСТО}. При
20 тестировании против трех недавно идентифицированных НАТ, C105 и CC12.1/CC12.3, два шиповидных белка дали сходные значения EC₅₀. В BLI шиповидный белок S2GΔHR2 показал более высокие сигналы связывания, чем шиповидный белок S2P_{ЕСТО} в наивысшей концентрации, показывая при этом сходную кинетику связывания. Применение НАТ P2B-2F6 для очистки
25 шиповидного белка приводило к гораздо более высокому выходу тримера с чистотой, сходной с таковой на колонке с CR3022, во фракциях ЭХ.

[00164] Подытоживая, мы демонстрируем, что делеция стебля HR2 может улучшить свойства шиповидного белка, и S2GΔHR2 может обеспечить лучший антиген шиповидного белка, который улучшается при мутации 2P.

30

Пример 6 Рациональная конструкция однокомпонентных и многослойных SApNP

[00165] Хотя было доказано, что можно конъюгировать тримерные шиповидные белки SARS-CoV-2 с SApNP с помощью системы SPY, случайное и необратимое химическое связывание приведет к нерегулярному экспонированию с незанятыми, но пространственно перекрытыми сайтами закрепления на поверхности. Система SPY, возможно, больше подходит для отдельных антигенов, таких как RBD. Таким образом, чтобы получить рациональную конструкцию однокомпонентных, многослойных, самособирающихся наночастиц с шиповидным белком, мы решили использовать подход слияния генов.

[00166] Нативные вирионы SARS-CoV-2 презентируют шиповидные белки как в состоянии до слияния, так и в состоянии после слияния на поверхности. Наша вакцинная стратегия направлена на разработку однокомпонентных, многослойных SApNP, каждая из которых презентирует 8 или 20 стабильных шиповидных белков S2GΔHR2 иммунной системе. Чтобы исследовать эту возможность, мы смоделировали шиповидный белок S2GΔHR2 на FR с 5-аминокислотным линкером G₄S, на E2p с 5-аминокислотным линкером G₄S и на I3-01v9 с 10-аминокислотным линкером (G₄S)₂, в результате чего получили большие SApNP с диаметрами 47,9 нм, 55,9 нм и 59,3 нм, соответственно. Три конструкции S2GΔHR2 SApNP временно экспрессировали в 400 мл клеток ExpiCHO с последующей очисткой с CR3022 и ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. Три отдельных цикла получения дали высокосогласованные профили ЭХ для всех трех конструкций, несмотря на вариации низкомолекулярных примесей, наблюдаемые для FR и E2p SApNP. После очистки CR3022/ЭХ мы получили в среднем 0,3-0,4 мг, 0,15-0,25 мг и 0,3-0,35 мг SApNP для S2GΔHR2-5GS-FR, S2GΔHR2-5GS-E2p-LD4-PADRE (или E2p-L4P) и S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-LD7-PADRE (или I3-01v9-L7P). В целом, S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-L7P, как представляется, характеризовались наилучшими свойствами с точки зрения выхода, чистоты и стабильности при получении.

[00167] Структурную целостность CR3022/ЭХ-очищенных SApNP характеризовали с помощью ЭМ с отрицательным окрашиванием, которая показала хорошо сформированные частицы в диапазоне 40-60 нм, что согласуется с моделированием. Шиповидные белки можно было легко распознать на поверхности SApNP. Антигенность S2GΔHR2-презентирующих SApNP

оценивали с использованием той же панели МАТ/НАТ. В ИФА три SApNP показали незначительно улучшенное связывание с некоторыми, но не всеми антителами по сравнению с индивидуальным шиповидным белком. В ВЛИ мы наблюдали четкую корреляцию между пиковым сигналом связывания и валентностью антигена с ранжированием E2p/I3-01v9 > FR > шиповидный белок. Экспонирование на двух 60-членных FR значительно улучшило связывание антител по сравнению с 24-членным FR.

[00168] Подводя итог, эти большие SApNP, подобные по размеру VLP, с 8 или 20 шиповидными белками на поверхности обеспечивают перспективные кандидатные вакцины для оценки *in vivo*.

Пример 7 Ответ связывающих антител, индуцированный вакциной против SARS-CoV-1/2

[00169] Отобранные иммуногены на основе RBD и шиповидного белка SARS-CoV-1/2 оценивали у мышей BALB/c для оценки индуцированного вакциной ответа антител (Фиг. 2). Группы из пяти мышей иммунизировали четыре раза с трехнедельными интервалами. Все вакцинные антигены изготавливали с использованием AddaVax, адъюванта на основе эмульсии «масло-в-воде», за исключением I3-01v9 SApNP, который был изготовлен с использованием фосфата алюминия (AP). Сначала мы выполняли продолжительный анализ ответа связывающих антител, измеренный по полумаксимальному эффективному разведению (ED_{50}) в двух группах, получавших вакцину против SARS-CoV-2 на основе RBD. Результаты исследования показаны на Фигуре 3. RBD SApNP (RBD-5GS-SPY-5GS-FR) вызывал значительно более высокие титры ED_{50} , чем размещенный на каркасе тример RBD (RBD-5GS-1TD0) на w2 и w5, независимо от покрывающего антигена, и показал значение P равное 0,0009 на w8, когда RBD использовали в качестве покрытия. По сравнению со стабилизированным шиповидным белком (S2GAHR2-5GS-1TD0) RBD SApNP вызывал значительно более высокие титры ED_{50} против RBD на w2, w5 и w8, демонстрируя сильный «эпитоп-фокусирующий» эффект. Сыворотки мышей связывали шиповидный белок SARS-CoV-1 с более низкими титрами ED_{50} , чем шиповидный белок SARS-CoV-2, но со сходными профилями. Затем мы выполняли продолжительный

анализ ответа связывающих антител, индуцированного двумя шиповидными белками SARS-CoV-2, S2P_{ЕСТО}-5GS-1TD0 и S2GΔHR2-5GS-1TD0, и тремя SApNP, каждая из которых экспонирует 8 или 20 шиповидных белков S2GΔHR2. Шиповидный белок S2GΔHR2 вызывал в 2~3 раза более высокие средние титры ED₅₀, чем шиповидный белок S2P_{ЕСТО}, независимо от покрывающего антигена, это свидетельствует о большей иммуногенности (следует отметить, что для облегчения справедливого сравнения сыворотки мышей из двух групп шиповидных белков тестировали против их соответствующих шиповидных белков).

10 **[00170]** Три SApNP проявили различные временные профили в зависимости от покрывающего антигена. Когда шиповидный белок использовали в качестве покрывающего антигена, группа I3-01v9 показала устойчивое увеличение среднего титра ED₅₀ с течением времени. Данная SApNP дала наивысший средний титр ED₅₀ в двух временных точках, w2 и w8, и значительно

15 превосходила шиповидный белок S2P_{ЕСТО} во всех временных точках. Меньший FR проявил сходный временной профиль с более низкими средними титрами ED₅₀, которые все еще значительно выше, чем у группы S2P_{ЕСТО}. Среди трех SApNP для E2p зарегистрировали самый низкий средний титр ED₅₀ на w2, который достиг самого высокого значения на w5 и незначительно снизился на w8.

20 С точки зрения RBD-специфичного ответа пять групп показали четкое ранжирование, основанное на их средних титрах ED₅₀, которое оставалось постоянным во всех временных точках. На w2 I3-01v9 вызывал средний титр ED₅₀ 175, тогда как все другие группы, получившие вакцину на основе шиповидного белка, показали слабый RBD-специфичный ответ. На w5 и w8 S2GΔHR2 вызывал

25 более высокие титры ED₅₀ (в среднем в 2 раза), чем S2P_{ЕСТО}, в то время как все три SApNP превосходили индивидуальный шиповидный белок S2GΔHR2, при этом ранжирование титров ED₅₀ коррелировало с их размером (FR<E2p<I3-01v9). Сыворотки реагировали с шиповидным белком SARS-CoV-1 сходным образом, хотя и на более низком уровне.

30 **[00171]** Наконец, мы сравнивали ответы связывающих антител, индуцированные тремя вакцинами против SARS-CoV-1 – шиповидным белком S2P_{ЕСТО} (S2P_{ЕСТО}-5GS-1TD0), размещенным на каркасе тримером RBD (RBD-

5GS-1TD0) и RBD SApNP (RBD-5GS-SPY-5GS-FR). Исходя из титров ED₅₀, шиповидный белок S2P_{ЕСТО} SARS-CoV-1, по-видимому, был более иммуногенным, чем шиповидный белок S2GΔHR2 SARS-CoV-2, тогда как RBD SARS-COV-1 SApNP был менее предпочтительным, чем его аналог SARS-COV-2.

- 5 Реактивность сыворотки с шиповидным белком S2P_{ЕСТО} SARS-CoV-2 наблюдали для всех трех групп, получивших вакцину против SARS-CoV-1.

[00172] Наши результаты, таким образом, показывают, что RBD SApNP могут вызывать титры RBD-специфичных антител на сходном или более высоком уровне по сравнению с шиповидным белком. Кроме того, шиповидный белок

- 10 S2GΔHR2 является более иммуногенным, чем широко используемый шиповидный белок S2P_{ЕСТО}, помимо его лучших свойств *in vitro*. Крупные многослойные E2p и I3-01v9 SApNP характеризуются наилучшими свойствами среди всех вакцин на основе шиповидного белка, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований вакцин против ВИЧ-1, ВГС и Эболы.

15

Пример 8 Ответ НАТ, вызванный вакциной против SARS-CoV-1/2

[00173] Одной из основных целей разработки вакцины против COVID-19 является создание мощного ответа НАТ, который может защитить от инфекции SARS-CoV-2. Анализы нейтрализации псевдочастиц (SARS-CoV-1/2pp)

- 20 использовали для оценки ответов НАТ в сыворотке, вызванных различными кандидатными вакцинами. Как свидетельствуют результаты, показанные на Фигуре 4, мы сначала выполняли продолжительный анализ ответа НАТ, измеренного по полумаксимальному ингибирующему разведению (ID₅₀) в двух группах, получавших вакцину на основе RBD SARS-CoV-2. RBD SApNP вызывал
- 25 низкие титры ответа НАТ против аутологичного SARS-CoV-2 уже на w2 и сохранял свое преимущество в двух более поздних временных точках, это свидетельствует о том, что такие вакцины на основе RBD SApNP могут вызывать быстрый ответ НАТ при вакцинации. Группа размещенного на каркасе тримера RBD показала самый низкий средний титр ID₅₀ на w5, но ответ НАТ,
- 30 сопоставимый с ответом, индуцированным стабилизированным шиповидным белком S2GΔHR2, на w8. Несколько другой профиль наблюдали в анализе SARS-CoV-1-pp. В первой временной точке, w2, ни одна из групп, получавших вакцину,

не показала какого-либо детектируемого гетерологического ответа НАТ. На w5 и w8 шиповидный белок S2GΔHR2 вызвал более мощный ответ НАТ на SARS-CoV-1, чем обе вакцины на основе RBD, это свидетельствует о том, что эпитопы, отличные от RBD, могут вносить вклад в перекрестную нейтрализацию.

5 [00174] Затем мы выполняли продолжительный анализ ответов НАТ, индуцированных пятью вакцинами на основе шиповидного белка. Что касается аутологичной нейтрализации, ни одна из вакцин на основе шиповидного белка не вызвала какого-либо ответа НАТ на SARS-CoV-2-pp на w2 после первой инъекции. Но для нейтрализации сыворотки на w5 и w8 наблюдали

10 последовательную закономерность: шиповидный белок S2P_{ЕСТО}, используемый почти во всех кандидатных вакцинах, которые в настоящее время проходят исследования с участием людей, показал самый низкий средний титр ID₅₀, 879 и 2481 на w5 и w8, соответственно; недавно разработанный шиповидный белок S2GΔHR2 индуцировал более сильный ответ НАТ, чем шиповидный белок

15 S2P_{ЕСТО}, со средними титрами ID₅₀, которые были выше в 2,8-6,7 раза, подтверждая положительный эффект обмена 2P на 2G и делеции стебля HR2; среди трех SApNP E2p характеризовался лучшими свойствами на w5, демонстрируя средний титр ID₅₀ 8493, что в 9,7 раза выше, чем S2P_{ЕСТО} и в 1,4 раза выше, чем S2GΔHR2, в то время как I3-01v9 показал наиболее мощный ответ

20 НАТ на w8 со средним титром ID₅₀ 17351, что в 7 раз и в 2,5 раза выше, чем таковой для S2P_{ЕСТО} и S2GΔHR2, соответственно. Сходный временной профиль ответа НАТ наблюдали в гетерологичном анализе SARS-CoV-1-pp. Стоит отметить, что I3-01v9 SApNP вызывал ответ НАТ против SARS-CoV-1 со средним титром ID₅₀ 351 на w2, тогда как во всех других группах не наблюдали

25 детектируемой нейтрализации. Тем не менее, наши результаты свидетельствуют о том, что вакцины на основе S2GΔHR2 SARS-CoV-2, в частности SApNP, могут обеспечить защиту от обоих SARS-CoV-1/2. Наконец, мы выполняли продолжительный анализ ответов НАТ, индуцированных тремя вакцинами против SARS-CoV-1. В аутологичном анализе SARS-CoV-1-pp шиповидный

30 белок S2P_{ЕСТО} и RBD SApNP индуцировали значительно более мощные ответы НАТ, чем размещенный на каркасе тример RBD на w2 и w5, и все три группы, получавшие вакцину, показали сходные титры ID₅₀ на w8. Однако гетерологичная

нейтрализация SARS-CoV-2 была ниже или на исходном уровне для трех вакцин SARS-CoV-1 на w2, w5 и w8.

[00175] Таким образом, наши результаты демонстрируют преимущество шиповидного белка S2GΔHR2 и S2GΔHR2-презентирующих SApNP по

- 5 отношению к шиповидному белку S2P_{ЕСТО} при сборе информации для НАТ. В то время как SApNP, презентующие RBD и S2GΔHR2 SARS-CoV-2, сопоставимы в вызове SARS-CoV-2-специфичного ответа НАТ, последний может обеспечить более широкую защиту от CoV, связанных с SARS.

10 **Пример 9** Т-клеточный ответ и безопасность вакцины

[00176] В то время как гуморальный иммунитет необходим для блокирования взаимодействия хозяина с вирусом и предотвращения вирусной инфекции, клеточный иммунитет необходим для устранения инфицированных клеток-хозяев для борьбы с вирусной инфекцией. Новые данные указывают на то, что ранний Т-клеточный ответ, а также Т-клеточная память являются критическими для защиты от SARS-CoV-2. Однако вакцины против COVID-19 должны индуцировать ответ CD4⁺ Т-хелперов 1 (Th1), но не Т-клеток типа Th2, поскольку последний был связан с вакцинно-ассоциированным усилением респираторных заболеваний (VAERD). Кроме того, фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh) играют важную роль в созревании и продукции НАТ. Поэтому понимание Т-клеточного ответа имеет решающее значение для разработки эффективной и безопасной вакцины против COVID-19.

- [00177]** Клетки Th1, продуцирующие интерферон (IFN)-γ, важны для создания оптимального гуморального ответа и для индукции клеточного иммунитета для устранения вирусов. Сначала мы исследовали влияние различных вакцинных составов против SARS-CoV-2 на индукцию ответов CD4⁺ Th1, специфичных в отношении шиповидного белка, на w11 – через две недели после четвертой иммунизации, когда Т-клетки памяти уже развились в селезенке. Спленоциты мыши из группы S2P и двух групп SApNP (E2p и I3-01v9) анализировали с помощью проточной цитометрии (FC) с использованием наивных образцов в качестве отрицательного контроля. Результаты исследований показаны на Фигуре 5. I3-01v9 индуцировал приблизительно в 1,5 и 2,3 раза более высокую частоту
- 25
- 30

IFN γ -продуцирующих CD4⁺ Th1-клеток, чем S2P и E2p, соответственно.

Примечательно, что после повторной стимуляции соответствующими антигенами в течение всего 4 часов обе группы E2p и I3-01v9 продуцировали CD107a-продуцирующие цитолитические CD4⁺ Т-клетки с ~2-кратно более высокой

5 частотой, чем группа S2P и наивная контрольная группа. IFN- γ /IL-4 (интерлейкин-4) двойные положительные клетки представляют собой CD4⁺ Т-клетки памяти, которые приобрели способность продуцировать IL-4, сохраняя при этом способность продуцировать IFN- γ в условиях Th1. Оказалось, что I3-01v9 индуцировал в 3 и 5 раз больше IFN- γ /IL-4-двойных положительных CD4⁺ Т-клеток памяти, чем S2P и E2p. Эти результаты свидетельствуют о том, что I3-01v9 может индуцировать сильные CD4⁺ Th1-клетки и IFN- γ /IL-4-двойные положительные CD4⁺ Т-клетки памяти.

[00178] Кроме того, I3-01v9 индуцировал больше IFN- γ /GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)-двойных 15 положительных эффекторных CD8⁺ Т-клеток, чем S2P и E2p, как показано на Фигуре 5. Эти данные свидетельствуют о том, что защитные CD8⁺ Т-клеточные ответы также были созданы у мышей, иммунизированных I3-01v9 SApNP.

Следует отметить, что CD8⁺ Т-клетки, полученные от мышей,

иммунизированных I3-01v9, но не S2P и E2p, приобрели способность быстро

20 продуцировать IFN- γ при повторной стимуляции антигеном, это свидетельствует об образовании I3-01v9-чувствительных эффекторных Т-клеток/Т-клеток памяти.

В совокупности наши результаты показывают, что S2G Δ HR2 I3-01v9 SApNP могут индуцировать мощные Т-клеточные ответы у мышей, состоящие из CD4⁺ Th1 клеток, IFN- γ /IL-4-двойных положительных CD4⁺ Т клеток памяти и CD8⁺ Т 25 клеток, что обеспечивает защитный клеточный иммунитет, необходимый для эффективной вакцины против SARS-CoV-2.

Пример 10 Некоторые примерные способы

[00179] Конструкция, экспрессия и очистка RBD SARS-CoV-2 и антигенов 30 шиповидного белка: Гены шиповидного белка (S) изолята SARS-CoV-1 Tor2 (номер доступа GenBank: NC_004718) и изолята SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (номер доступа GenBank: MN908947) использовали для конструирования всех

конструкций RBD и шиповидных белков после оптимизации кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих. Последовательность RBD определяется как P317-D518 и P330-N532 для SARS-CoV-1 и 2, соответственно. Последовательность S_{ECTO} определяется как M1-Q1190 и M1-Q1208 для SARS-CoV-1 и 2, соответственно. Для удаления сайта расщепления S1/S2 в шиповидные белки SARS-CoV-1 и 2, соответственно, вводили мутацию R667G и модификацию ⁶⁸²GSAGSV⁶⁸⁷ (SEQ ID NO:18). Мутацию 2P (или 2G) вводили в K968/V969 и K986/V987 в шиповидных белках SARS-CoV-1 и 2, соответственно. С-концевую область SARS-CoV-2 (E1150-Q1208), содержащую стебель HR2, удаляли из S2G_{ECTO}, в результате чего получали конструкцию шиповидного белка с удаленным HR2, названную S2GΔHR2. Вирусный капсидный белок SHP (PDB: 1TD0) использовали в качестве мотива тримеризации в конструкциях шиповидного белка для иммунизации, в то время как домен фолдона из фибритина бактериофага T4 (PDB: 1RFO) использовали при нанесении покрытия антигенов шиповидного белка для ИФА для маскировки гуморального ответа, полученного для 1TD0. Все конструкции подвергали временной экспрессии в клетках ExpiCHO (Thermo Fisher). В общих чертах, клетки ExpiCHO размораживали и инкубировали с экспрессионной средой ExpiCHO™ (Thermo Fisher) в инкубаторе с перемешиванием при 37 °C, 135 об./мин и 8% CO₂. Когда клетки достигали плотности 10×10⁶ мл⁻¹, добавляли экспрессионную среду ExpiCHO™ для снижения плотности клеток до 6×10⁶ мл⁻¹ для трансфекции. Комплексы ExpiFectamin™ CHO/плазмидная ДНК получали для трансфекции 100 мл клеток ExpiCHO в соответствии с инструкциями изготовителя. Для определенной конструкции 100 мкг плазмиды и 320 мкл реагента ExpiFectamin™ CHO смешивали в 7,7 мл холодной среды OptiPRO™ (Thermo Fisher). После первого внесения питательной среды на первый день клетки ExpiCHO культивировали в инкубаторе с перемешиванием при 33°C, 115 об./мин и 8% CO₂ в соответствии с протоколом Max Titer с дополнительным добавлением питательной среды на пятый день (Thermo Fisher). Супернатанты культуры собирали на 13-14 день после трансфекции, очищали с помощью центрифугирования при 4000 об./мин в течение 25 мин и фильтровали с использованием фильтра с диаметром пор 0,45 мкм (Thermo Fisher). Колонку с

антителом CR3022 использовали для экстракции антигенов SARS-CoV-1/2 из супернатантов, после чего проводили ЭХ на колонке Superdex 200 10/300 GL (для размещенного на каркасе тримера RBD) или колонке Superose 6 10/300 GL (для RBD-SPY-NP, шиповидных белков и НЧ, презентирующих шиповидный белок).

- 5 Для сравнения His-меченый шиповидный белок Sesto-5GS-1TD0 экстрагировали из супернатантов с использованием колонки с иммобилизованным Ni SepharoseTM Excel (GE Healthcare) и элюировали 500 мМ имидазолом перед ЭХ.

Концентрацию белка определяли с применением УФ₂₈₀-поглощения с теоретическими коэффициентами экстинкции.

- 10 **[00180]** *Голубой нативный* электрофорез в полиакриламидном геле: Шиповидные белки SARS-CoV-2 и НЧ, презентирующие шиповидные белки, анализировали с помощью *голубого нативного* электрофореза в полиакриламидном геле (BN-PAGE) и окрашивали Кумасси синим. Белки смешивали с буфером для образцов и красителем для загрузки G250 и добавляли к 4-12% Bis-Tris гелю NativePAGETM (Life Technologies). Гели BN-PAGE анализировали в течение 2-2,5 часа при 150 В с применением буфера для анализа NativePAGETM (Life Technologies) согласно инструкциям производителя.

- 15 **[00181]** Твердофазный иммуноферментный анализ: Каждую лунку 96-луночного аналитического планшета CostarTM (Corning) сначала покрывали 50 мкл ФСБ, содержащего 0,2 мкг соответствующих антигенов. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем промывали пять раз промывочным буфером, содержащим ФСБ и 0,05% (об./об.) Tween 20. Затем каждую лунку покрывали 150 мкл блокирующего буфера, состоящего из ФСБ, 40 мг мл⁻¹ блокатора, категории приемлемой для блоттинга (Bio-Rad), и 5% (об./об.) ФБС.
- 20 Планшеты инкубировали с блокирующим буфером в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали пять раз промывочным буфером. Для связывания антигена антитела разбавляли в блокирующем буфере до максимальной концентрации 5 мкг мл⁻¹ с последующим 10-кратным серийным разведением. Для каждого разведения антитела в соответствующие лунки добавляли объем равный в общей сложности 50 мкл. Для анализа образцов мыши сыворотку или плазму 20-кратно разводили в блокирующем буфере и подвергали 10-кратному серийному разведению. Для каждого разведения образца в лунки
- 25
- 30

добавляли объем равный в общей сложности 50 мкл. Каждый планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали 5 раз ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20. Для связывания антител в промывочном буфере (ФСБ, содержащий 0,05% Tween 20) готовили разведение 1:5000 козьего антитела против IgG человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) или для анализа образцов мыши готовили разведение 1:3000 козьего антитела против IgG человека, меченного пероксидазой хрена (ПХ) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), и затем добавляли 50 мкл этого разведенного вторичного антитела в каждую лунку. Планшеты инкубировали с вторичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали 5 раз ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20. Наконец, окрашивание в лунках проявляли с использованием 50 мкл ТМВ (Life Sciences) в течение 3-5 минут перед остановкой реакции 50 мкл 2 н. серной кислоты. Полученные показания планшета измеряли при длине волны 450 нм. Следует отметить, что связывание сыворотки на w2 не достигло плато (или насыщения), чтобы обеспечить точное определение титров ED₅₀. Тем не менее, значения ED₅₀ на w2 получали путем установки нижних/верхних ограничений OD₄₅₀ на уровне 0,0/3,2 для облегчения сравнения различных групп вакцин в первый момент времени.

[00182] Интерферометрия биослоя: Кинетику связывания антигенов вакцины против SARS-CoV-1/2, RBD в сравнении с НЧ, презентирующими RBD, а также шиповидного белка в сравнении с НЧ, презентирующими шиповидный белок, с панелью известных антител измеряли с использованием прибора Octet RED96 (FortéBio, Pall Life Sciences). Все анализы выполняли при встряхивании, заданном на 1000 об./мин, в 1× кинетическом буфере FortéBio. Конечный объем всех растворов составил 200 мкл на лунку. Анализы выполняли при 30°C в непрозрачных черных 96-луночных планшетах (Geiger Bio-One). Для всех антигенов, за исключением S2GAHR2-НЧ, 5 мкг мл⁻¹ антитела в 1× кинетическом буфере загружали на поверхность захватывающих биосенсоров против Fc человека (АНС) на 300 с. Для S2GAHR2-НЧ использовали количественные биосенсоры против Fc человека (АНQ). Перед анализом ассоциации антитела на биосенсоре с антигеном в растворе в течение 200 с проводили стадию получения базовой линии биосенсора в течение 60 с. В шести сериях титрования

использовали двукратный концентрационный градиент антигена, начиная с 950 нМ для размещенных на каркасе тримеров RBD, 37 нМ для RBD-5GS-SPY-5GS-FR НЧ, 150 нМ для тримеров шиповидного белка и 9/3,5/3,5 нМ для S2GΔHR2, презентируемого на FR/E2p/I3-01v9 НЧ. Диссоциацию взаимодействия

5 отслеживали в течение 300 с. Коррекцию сдвига базовой линии проводили посредством вычитания усредненного сдвига, зарегистрированного для сенсора с нанесенным антителом, но не инкубированного с антигеном, или сенсора без антитела, но инкубированного с антигеном. Данные, полученные на приборе Octet, обрабатывали с применением программного обеспечения для получения

10 данных FortéBio v.8.1. Экспериментальные данные аппроксимировали с использованием уравнений связывания, описывающих взаимодействие 2:1, для достижения оптимальной аппроксимации. Следует отметить, что связывание тримера S2GΔHR2 также измеряли с использованием AHQ для облегчения сравнения связывания антитела с НЧ, презентирующими S2GΔHR2.

15 **[00183]** Оценка конструкций наночастиц методом электронной микроскопии (ЭМ): Первоначальный анализ RBD и S2GΔHR2-презентирующих НЧ методом ЭМ проводили в Центре коллективного пользования электронной микроскопии в Научно-исследовательском институте Скриппса. В общих чертах, образцы НЧ готовили в концентрации 0,01 мг/мл. Медные сетки с углеродным покрытием

20 (400 меш) подвергали воздействию тлеющего разряда, и 8 мкл каждого образца адсорбировали в течение 2 минут. Избыток образца удаляли, и сетки негативно окрашивали 2% формиадом уранила в течение 2 минут. Избыточное окрашивание удаляли, и сетки оставляли высыхать. Образцы анализировали при 80 кВ с помощью просвечивающего электронного микроскопа Talos L120C (Thermo

25 Fisher), и изображения получали с помощью камеры CETA 16M CMOS.

[00184] Иммунизация животных и сбор образцов: Сходные протоколы иммунизации были описаны в наших предыдущих исследованиях вакцин на основе НЧ. В общих чертах, руководящие принципы Институционального комитета по уходу за животными и их использованию (IACUC) соблюдали на

30 животных субъектах, протестированных в исследовании иммунизации. Восьминедельных мышей BALB/c приобретали у The Jackson Laboratory и помещали в вентилируемые клетки в помещениях с контролируемой

окружающей средой в Научно-исследовательском институте Скриппса в соответствии с утвержденным протоколом IACUC и международными рекомендациями AAALAC (Международная ассоциация по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных). Мышей

5 иммунизировали на неделях 0, 3, 6 и 9, используя 200 мкл смеси антиген/адъювант, содержащей 50 мкг вакцинного антигена и 100 мкл адъюванта, AddaVax или Adju-Phos (InvivoGen), внутрибрюшинным (в/б) путем. Кровь собирали через две недели после каждой иммунизации. Все заборы крови выполняли через ретроорбитальный синус с использованием

10 гепаринизированных капиллярных трубок в пробирки с покрытием ЭДТА. Образцы разбавляли равным объемом ФСБ, а затем наслаивали на 4,5 мл Ficoll в 15 мл пробирке SepMate™ (STEMCELL Technologies) и центрифугировали при 1200 об./мин в течение 10 мин при 20°C для отделения плазмы и клеток. Плазму инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин, центрифугировали при

15 1200 об./мин в течение 10 мин, и стерильно фильтровали. Клетки промывали один раз в ФСБ, а затем ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса эритроцитов ACK (Lonza). После промывки ФСБ моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) ресуспендировали в 2 мл среды для замораживания Vambanker (Lymphotec). Селезенки также собирали и пропускали через клеточное сито с

20 размером пор 70 мкм (BD Falcon) для высвобождения спленоцитов в клеточную суспензию. Спленоциты центрифугировали, промывали в ФСБ, обрабатывали 5 мл лизирующего буфера ACK (Lonza) и замораживали с 3 мл среды для замораживания Vambanker. Сыворотки инактивировали нагреванием для анализа связывания методом ИФА и нейтрализации псевдовирuses.

25 **[00185]** Анализ нейтрализации псевдовируса SARS-CoV-1/2: Анализы нейтрализации псевдочастиц (SARS-CoV-1/2-pp) использовали для оценки нейтрализующей активности ранее описанных антител и индуцированного вакциной ответа мышинных антител. SARS-CoV-1/2pp создавали путем совместной трансфекции клеток HEK293T плазмидой HIV-1 pNL4-3.lucR-E

30 (программа реагентов против СПИДа NIH) и экспрессионной плазмидой, кодирующей ген S-белка изолята SARS-CoV-1 Tor2 (номер доступа GenBank: NC_004718) и изолята SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (номер доступа GenBank:

MN908947), в соотношении 4:1 с помощью липофектамина 3000 (Thermo Fisher Scientific). Через 48-72 часа SARS-CoV-1/2pp собирали из супернатанта с помощью центрифугирования при 4000 об./мин в течение 10 мин, аликвотировали и хранили при -80 °С перед использованием. МАТ в начальной

5 концентрации 0,1-10 мкг/мл или сыворотку мыши в начальном 100-кратном разведении смешивали с супернатантом, содержащим SARS-CoV-1/2pp, и инкубировали в течение 1 часа при 37°С в 96-луночном планшете с белым непрозрачным дном (Corning). В анализе использовали серию 3-кратных разведений. Клеточную линию HEK293T-hACE2 (каталожный номер: NR-52511)

10 и вектор pcDNA3.1(-), содержащий ген шиповидного белка SARS-CoV-2 (каталожный номер: NR52420), получали из BEI RESOURCES и использовали в анализах нейтрализации псевдовирuсов. В общих чертах, клетки HEK293T-hACE2 при 1×10^4 добавляли в каждую лунку, и планшет инкубировали при 37°С в течение 48 часов. После инкубации вышележащую среду удаляли и лизировали

15 клетки. Сигнал люциферазы светлячка из инфицированных клеток определяли с использованием системы анализа люциферазы Bright-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Данные извлекали из считывающего устройства для микропланшетов BioTek с помощью программного обеспечения Gen 5, из каждой лунки вычитали среднюю фоновую

20 люминесценцию из ряда неинфицированных лунок и строили кривые нейтрализации с использованием GraphPad Prism 8.4.3, на которых значения из лунок сравнивали с лункой, содержащей только SARS-CoV-1/2pp. Те же векторы ВИЧ-1, псевдотипированные с использованием гена Env вируса лейкоза мышей (MLV), называемые MLV-pp, продуцировали в клетках HEK293T и включали в

25 анализы нейтрализации в качестве отрицательного контроля.

[00186] Продукция дендритных клеток (ДК): Мышиный костный мозг (ВМ) культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и рекомбинантный мышиный Flt3L (50 нг/мл) и SCF (10 нг/мл), в течение 9 дней. Чтобы индуцировать активацию ДК, незрелые ДК инкубировали

30 с липополисахаридом (ЛПС, 100 нг/мл), R848 (резиквимод, 100 нг/мл) или CpG (ODN 1585, 1 мкМ) в течение ночи, которые активировали передачу сигналов Toll-подобного рецептора (TLR)4, TLR7/8 или TLR9, соответственно. Клетки

собирали для экспериментов. пДК сортировали для выделения CD11c+B220+ клеток с использованием сортировщика клеток FACS и магнитных гранул (Miltenyi-Biotech, Калифорния, США).

[00187] Анализ антител (АТ) и проточная цитометрия: Все антитела,

- 5 используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания, приобретали у eBioscience (Сан-Диего, Калифорния, США), BioLegend (Сан-Диего, Калифорния, США) или BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния, США). Конъюгированные с магнитными микрогранулами антитела и стрептавидин приобретали у Miltenyi-Biotech (Оберн, Калифорния, США). Рекомбинантный белок IL-2 человека
- 10 приобретали у R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США). Рекомбинантный лиганд Flt3 мыши (Flt3L) и SCF мыши приобретали у Shenandoah Biotech (Уорик, Пенсильвания, США). Клетки окрашивали соответствующими концентрациями МАТ. Мертвые клетки исключали с использованием фиксируемого красителя для определения жизнеспособности от eBioscience (Сан-Диего, Калифорния, США).
- 15 Анализы методом проточной цитометрии выполняли с использованием цитометров LSRII (BD Bioscience, Калифорния, США) и Canto (Becton Dickinson, Нью-Джерси, США). Клетки сортировали на BD FACSAria II (BD Bioscience, Калифорния, США).

[00188] Культивирование и активация Т-клеток: Мононуклеарные клетки селезенки от иммунизированных мышей культивировали в присутствии ДК с импульсным добавлением S2P, E2P и I3-01 или без них в полной среде IMDM, содержащей IL-2 (5,0 нг/мл). Клетки собирали через 16 часов для внутриклеточного окрашивания цитокинов и анализа методом проточной цитометрии.

- 25 **[00189]** Статистика: В анализе титра антител сравнение групп различных вакцин выполняли в GraphPad Prism 8.4.3 с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента. В анализе Т-клеток сравнение средних значений проводили с использованием двустороннего непарного t-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа, а затем апостериорного t-критерия.
- 30 Значения Р равные 0,05 или менее считали значимыми.

[00190] Таким образом, настоящее изобретение было раскрыто в общих чертах и проиллюстрировано со ссылкой на типичные варианты реализации, описанные выше. Следует понимать, что возможны различные модификации настоящего изобретения в пределах его сущности и объема.

- 5 **[00191]** Также дополнительно следует отметить, что все публикации, номера доступа последовательностей, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящей заявке, таким образом специально включены посредством ссылки в полном объеме и для всех целей, как если бы каждая из них была отдельно включена в настоящую заявку. Определения, содержащиеся в тексте и
- 10 включенные посредством ссылки, исключены в случаях их противоречия определениям согласно настоящему изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Сконструированный иммуногенный полипептид, полученный из шиповидного белка (S) коронавируса, содержащий измененную последовательность растворимого S-белка, которая имеет модификации по сравнению с последовательностью растворимого S-белка дикого типа коронавируса, которые стабилизируют структуру S-белка перед слиянием, причем указанные модификации содержат (а) мутацию, которая инактивирует сайт расщепления S1/S2, и (б) мутацию в области поворота между областью гептадного повтора 1 (HR1) и областью центральной спирали (CH), которая препятствует образованию прямой спирали HR1 и CH во время слияния.

2. Иммуногенный полипептид по п. 1, дополнительно содержащий усечение области гептадного повтора 2 (HR2).

3. Иммуногенный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, причем указанная мутация, инактивирующая сайт расщепления S1/S2, содержит замену ⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (SEQ ID NO:19) GSAG (SEQ ID NO:20), и указанная мутация в области поворота содержит двойную мутацию K986G/V987G, K986P/V987P, K986G/V987P или K986P/V987G, причем нумерация аминокислот основана на крио-ЭМ модели PDB ID 6VSB.

4. Иммуногенный полипептид по п. 3, отличающийся тем, что указанная последовательность растворимого S-белка дикого типа содержит последовательность SEQ ID NO:14 или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

5. Иммуногенный полипептид по п. 4, дополнительно содержащий усечение HR2 (SEQ ID NO:9) на С-конце указанной последовательности растворимого S-белка дикого типа.

6. Иммуногенный полипептид по п. 5, дополнительно содержащий N-концевую лидерную последовательность, показанную в SEQ ID NO:15.

7. Иммуногенный полипептид по п. 5, дополнительно содержащий мотив тримеризации на С-конце.

8. Иммуногенный полипептид по п. 7, отличающийся тем, что указанный мотив тримеризации содержит фолдон (SEQ ID NO:26) или вирусный капсидный белок SHP (SEQ ID NO:27), или их по существу идентичную последовательность или вариант с консервативными модификациями.

9. Иммуногенный полипептид по п. 5, содержащий указанную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO:32-37, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными модификациями.

10. Иммуногенный полипептид по п. 1, дополнительно содержащий указанную последовательность субъединицы самособирающейся наночастицы, которая слита с С-концом указанной измененной последовательности растворимого S-белка.

11. Полинуклеотидная последовательность, которая кодирует иммуногенный полипептид по п. 3.

12. Полинуклеотидная последовательность по п. 11, отличающаяся тем, что указанный иммуногенный полипептид дополнительно содержит N-концевую лидерную последовательность.

13. Полинуклеотидная последовательность по п. 11, кодирующая слитый полипептид, содержащий иммуногенный полипептид, который слит на своем С-конце с N-концом указанной последовательности субъединицы самособирающейся наночастицы.

14. Композиция вакцины против коронавируса, содержащая иммуногенный полипептид по п. 1, который экспонируется на поверхности самособирающейся наночастицы.

15. Композиция вакцины по п. 14, отличающаяся тем, что указанная самособирающаяся наночастица содержит тримерную

последовательность, и причем С-конец указанного иммуногенного полипептида слит с N-концом указанной последовательности субъединицы наночастицы.

16. Композиция вакцины по п. 14, отличающаяся тем, что указанная самособирающаяся наночастица содержит I3-01, E2p или ферритин.

5 **17.** Композиция вакцины по п. 14, дополнительно содержащая сцепляющий домен и/или Т-клеточный эпитоп, который слит с С-концом указанной последовательности субъединицы наночастицы.

18. Композиция вакцины по п. 14, содержащая: (1) полипептидную последовательность, содержащую от N-конца к С-концу (а) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность наночастицы I3-01v9, (b) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность наночастицы E2p, или (с) сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, линкерную последовательность GS и последовательность ферритина наночастицы; или (2) вариант указанной полипептидной последовательности с консервативными модификациями.

19. Композиция вакцины по п. 18, отличающаяся тем, что указанный сконструированный иммуногенный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2 содержит (а) замену сайта расщепления S1/S2 ⁶⁸²RRAR⁶⁸⁵ (SEQ ID NO:19) GSAG (SEQ ID NO:20), (b) двойные мутации K986G/V987G в области поворота и (с) усечение HR2 (SEQ ID NO:9) на С-конце указанной последовательности растворимого S-белка дикого типа; причем нумерация аминокислот основана на крио-ЭМ модели PDB ID 6VSB.

25 **20.** Композиция вакцины по п. 18, отличающаяся тем, что указанный сконструированный иммуногенный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2 содержит SEQ ID NO:33 или 34, или ее вариант с консервативными модификациями.

21. Композиция вакцины по п. 20, содержащая (1) полипептидную последовательность, содержащую от N-конца к С-концу (а) указанный сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:22),
5 последовательность наночастицы, показанную в SEQ ID NO:23 (I3-01v9), сцепляющий домен, показанный в SEQ ID NO:29 (LD7), и Т-клеточный эпитоп, показанный в SEQ ID NO:30, (b) указанный сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность G_4S (SEQ ID NO:21), последовательность субъединицы
10 наночастицы, показанную в SEQ ID NO:24 (E2p), сцепляющий домен, показанный в SEQ ID NO:28 (LD4), и Т-клеточный эпитоп, показанный в SEQ ID NO:30, или (с) указанный сконструированный полипептид шиповидного белка SARS-CoV-2, показанный в SEQ ID NO:33, линкерную последовательность G_4S (SEQ ID NO:21), последовательность наночастицы, показанную в SEQ ID NO:25 (ферритин); или
15 (с) вариант указанной полипептидной последовательности с консервативными модификациями.

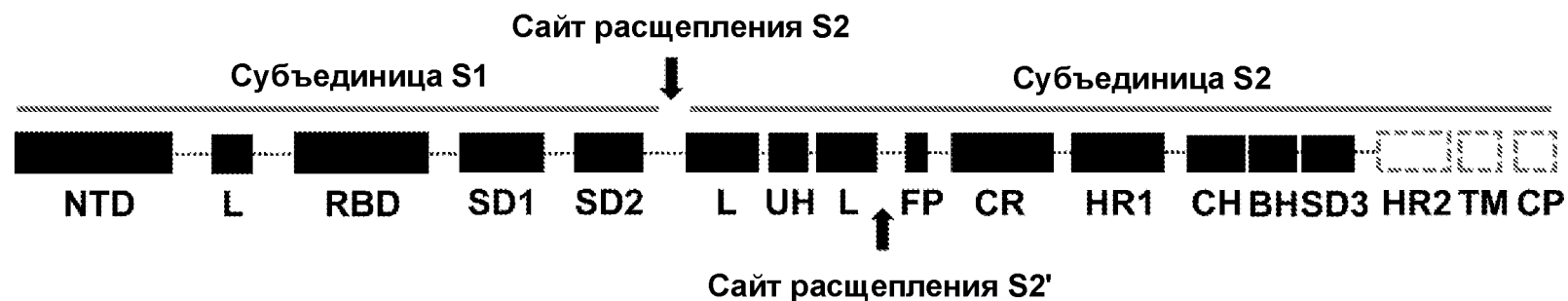
22. Композиция вакцины по п. 20, содержащая указанную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO:38-40, или по существу идентичную ей последовательность или ее вариант с консервативными
20 модификациями.

23. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептидную последовательность, отличающаяся тем, что указанная полипептидная последовательность содержит последовательность субъединицы композиции вакцины по п. 15.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию вакцины по п. 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Способ предотвращения или лечения инфекции SARS-CoV-2 у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтически эффективного количества композиции вакцины по п. 14.

ФИГ. 1



Субъединица S1 коронавируса

NTD, N-концевой домен;

L, линкерная область;

RBD, рецепторсвязывающий домен;

SD1, субдомен 1;

SD2, субдомен 2;

Субъединица S2 коронавируса

UH, восходящая спираль;

CR, соединительная область;

CH, центральная спираль;

SD3, субдомен 3;

TM, трансмембранная область/домен;

CT, цитоплазматический хвост.

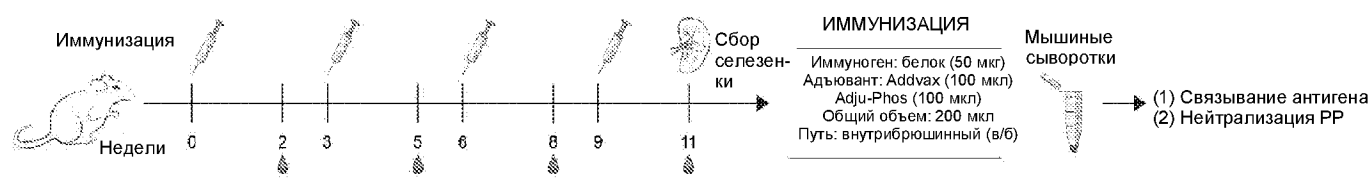
FP, пептид слияния;

HR1, гептадный повтор 1;

BH, β -шпилька;

HR2, гептадный повтор 2;

ФИГ. 2



ФИГ. 3

Значения ED₅₀ в ИФА сыворотки мыши

Антиген покрытия	SARS-CoV-1 S2P-5GS-фолдон	SARS-CoV-2 вакцинный антиген	w2					w5					w8					w11				
			M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
		S2P-5GS-1TD0	337	378	438	92	186	8229	14588	15271	11029	15730	31348	19923	49495	20899	27382	87983	74675	105473	61814	98729
		S2GΔHR2-5GS-1TD0	160	300	42	264	<20	29889	9934	11211	21972	2225	54736	33977	31597	69701	7331	104856	65140	102307	125912	44213
		S2GΔHR2-5GS-FR	207	379	607	463	182.2	35236	32621	25025	47534	14631	28314	48030	53004	81962	12542	73512	110204	85167	152546	35108
		S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P	161	145	111	244	64	38631	34068	49277	62620	14788	78610	48384	69459	83674	45019	101670	68785	75147	83008	78758
		S2GΔHR2-10GS-13-01v9-L7P	2047	1697	2368	2434	2342	33863	59267	13184	67367	77688	136410	136928	130590	190018	126344	-	-	-	-	-
		SARS-CoV-2 вакцинный антиген	w2					w5					w8					w11				
			M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
	SARS-CoV-2 S2GΔHR2-5GS-фолдон	S2P-5GS-1TD0	342	584	786	152	186	20525	30418	47919	16989	28307	71336	43544	104033	32473	51430	168104	101372	164947	77599	138078
		S2GΔHR2-5GS-1TD0	1623	2329	915	1190	<20	86704	68697	51587	77015	8682	188541	133257	137492	308124	53005	848885	297908	427211	524920	103434
		S2GΔHR2-5GS-FR	1188	2365	4609	2102	1925	100424	99021	105640	217243	94779	112191	207821	177619	227282	43471	240083	710983	381028	592260	118127
		S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P	748	481	288	1132	435	168389	197889	167303	549503	74184	209083	153974	150854	388845	173525	500160	324937	275279	631496	369062
		S2GΔHR2-10GS-13-01v9-L7P	3695	5177	3135	4338	3353	147140	146498	19018	197789	152653	239618	402217	162383	412328	272905	-	-	-	-	-
SARS-CoV-2 RBD	SARS-CoV-2 вакцинный антиген	S2P-5GS-1TD0	w2					w5					w8					w11				
			M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
		S2P-5GS-1TD0	<20	<20	<20	<20	<20	1801	979.6	2893	260.2	1533	7881	1861	8448	1952	3948	15828	8935	10888	5828	14807
		S2GΔHR2-5GS-1TD0	26	24	<20	<20	<20	4693	1161	703.1	5881	750.5	13835	3578	3906	28190	4453	32268	8328	9751	40928	6118
		S2GΔHR2-5GS-FR	<20	<20	22	<20	21	3340	5205	3799	3229	1900	5996	15596	18918	14222	2263	11360	44589	35885	32006	7947
		S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P	<20	<20	<20	21	<20	5425	9801	6186	22436	3554	10682	19414	10367	36238	10091	17641	32324	17662	64941	23122
		S2GΔHR2-10GS-13-01v9-L7P	112	384	159	73	151	16265	16054	1920	16797	17388	24415	49820	15028	51700	41325	-	-	-	-	-

Значения ID₅₀ нейтрализации сыворотки мыши

Псевдовирус

SARS-CoV-1-pp

SARS-CoV-2 вакцинный антиген	W2					W5					W8					W11				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
S2P-5GS-1TD0	<100	<100	<100	<100	<100	405	444	1032	270	501	776.6	1062	3410	1121	3783	2588	2431	9374	1074	1606
S2GΔHR2-5GS-1TD0	<100	<100	<100	<100	<100	17433	3960	2747	5170	<100	13124	7579	3443	7902	221	11228	4377	3271	6009	4176
S2GΔHR2-5GS-FR	<100	<100	<100	<100	<100	4152	8773	5414	10007	3527	3735	5988	8443	7805	3872	3384	4103	5704	8194	2697
S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P	<100	<100	<100	<100	<100	7954	10197	23509	17140	2915	7676	18213	17917	19538	4017	9170	5851	13334	12484	4799
S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-L7P	278	330	247	486	417	8250	11666	6895	15034	8694	14174	14888	22024	21474	9393					

Псевдовирус

SARS-CoV-2-pp

SARS-CoV-2 вакцинный антиген	w2					w5					w8					w11				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
S2P-5GS-1TD0	<100	<100	<100	<100	<100	1050	787	1524	369	867	3515	3189	2897	1141	1683	11358	7358	10878	10723	7868
S2GΔHR2-5GS-1TD0	<100	<100	<100	<100	<100	18419	3271	3238	4382	263	12641	4656	6148	9680	1707	27622	13489	18860	31117	4173
S2GΔHR2-5GS-FR	<100	<100	<100	<100	<100	3065	8659	8044	5184	1072	4156	12681	14238	6453	1827	11054	31423	28556	19137	6777
S2GΔHR2-5GS-E2p-L4P	<100	<100	<100	<100	<100	5778	11850	7370	18399	977	8613	14120	5999	19054	4733	13128	28298	18219	77734	12356
S2GΔHR2-10GS-I3-01v9-L7P	<100	<100	<100	<100	<100	5485	5151	1440	6831	4722	14884	22060	12830	23608	13575					

ФИГ. 5

