

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390189** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.06

(22) Дата подачи заявки
2021.07.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/21* (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/20 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

**(54) КОНСТРУКЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИННОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ
СЛИТОГО БЕЛКА**

(31) 202010623708.8; 202110353488.6

(32) 2020.07.01; 2021.03.31

(33) CN

(86) PCT/CN2021/103931

(87) WO 2022/002180 2022.01.06

(71) Заявитель:

**ИНСТИТУТ ОФ БАЙОФИЗИКС,
ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ ОФ
САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:

**Фу Янсинь, Пэн Хуа, Сунь Шиюй
(CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конструкции и применению вакцинной платформы на основе слитого белка. Настоящее изобретение относится к вакцине, включающей слитый белок, содержащий интерферон-целевой антиген-Fc область иммуноглобулина (или антитело) и Т-хелперный эпитоп. Настоящее изобретение также относится к применению слитого белка, содержащего интерферон-целевой антиген-Fc область иммуноглобулина (или антитело) и Т-хелперный эпитоп, для получения профилактических или терапевтических композиций. Вакцина по настоящему изобретению может быть получена при помощи эукариотических клеточных систем экспрессии для получения вакцин, содержащих дикого типа и различные мутантные антигены, и вакцинация подкожным/мышечным или назальным или другими путями может привести к сильному иммунному ответу организма. Вакцину по настоящему изобретению можно использовать в качестве профилактической или терапевтической вакцины.

A1

202390189

202390189

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577064EA/55

КОНСТРУКЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИННОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ СЛИТОГО БЕЛКА

Область, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области генной инженерии и биомедицинской технологии, и в частности, относится к вакцинам, например к вакцине, включающей слитый белок, содержащий интерферон-целевой антиген-Fc-область иммуноглобулина (антитело) в качестве каркаса. Вакцину по настоящему изобретению можно использовать в качестве вакцинной платформы для профилактики инфекции, вызываемой вирусом гепатита В (HBV), вирусом папилломы человека (HPV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARA-COV2), заражения вирусом гриппа и развития опухолей, связанных с HPV, EBV, а также для лечения хронического вирусного гепатита В (СНВ) и связанных с HBV, HPV и EBV опухолей.

Предпосылки к созданию изобретения

В мире насчитывается около 257 миллионов хронических HBV инфекций, и около 887000 человек ежегодно умирают от терминальных стадий заболеваний печени, вызванных HBV, включая печеночную недостаточность, цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному [1-3]. Около 30% случаев цирроза печени вызваны HBV, и около 40% случаев гепатоцеллюлярной карциномы (НСС) вызваны HBV [4]. Инфекция HBV остается серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Однако до сих пор не существует эффективной стратегии лечения хронического гепатита В. Существующие методы лечения HBV в основном включают противовирусные препараты (нуклеозидные/нуклеотидные аналоги) и интерферон. Хотя они обладают определенным терапевтическим эффектом, они обычно не могут индуцировать эффективный иммунный ответ, поэтому HBV-инфекция не может быть полностью устранена; более того, длительный прием может привести к значительным побочным эффектам, а противовирусные препараты также могут привести к лекарственной резистентности. Хроническая HBV-инфекция является одним из основных заболеваний, угрожающих здоровью человека. Необходимо изучить эффективные стратегии иммунотерапии хронического гепатита В. Разработка терапевтических вакцин против хронического гепатита В имеет очень важное социальное и экономическое значение.

Сезонный грипп вызывает тяжелые заболевания у 1-4 миллионов человек и ежегодно убивает 200000-500000 человек [5]. Лучшим способом профилактики и борьбы с гриппом является вакцинация, которая снижает заболеваемость и снижает тяжесть инфекции, особенно у детей младшего возраста и пожилых людей, подверженных высокому риску осложнений гриппа. Несмотря на то, что одобренные в настоящее время вакцины против гриппа обеспечивают хороший защитный эффект у здоровых молодых людей, все еще есть некоторые проблемы, которые необходимо решить. Например,

производство некоторых вакцин зависит от куриных эмбрионов, например инактивированных вакцин против гриппа и аттенуированных вакцин против гриппа. Недостатком этих вакцин является то, что, если преобладающие штаммы вируса имеют происхождение от домашней птицы, эпидемия заболевания приведет к увеличению потребности в вакцинах и куриных эмбрионах, что приведет к дефициту поставки куриных эмбрионов [6]. Другим недостатком является то, что производство этих вакцин требует огромного количества времени. Пожилые люди более склонны к тяжелым синдромам вируса гриппа, а стандартные вакцины, как правило, неэффективны для пожилых людей, чья иммунная система с возрастом постепенно ослабевает [7]. Учитывая проблемы, с которыми сталкиваются современные противогриппозные вакцины, в связи с распространенностью вирусов гриппа существует острая необходимость в противогриппозной вакцине, которая обладает сильной иммуногенностью, не зависит от куриных эмбрионов и может быть получена быстро.

Коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома(SARS-CoV-2) представляет собой патоген, вызвавший пандемию коронавирусного заболевания 2019 года (COVID-19). Клинические симптомы, вызываемые SARS-CoV-2, в основном включают бессимптомную инфекцию, легкие гриппоподобные симптомы, пневмонию и тяжелый острый респираторный дистресс-синдром, который в тяжелых случаях может привести к смерти инфицированных пациентов. В настоящее время не существует специфического лекарственного средства против SARS-CoV-2, и вакцина является основной контрмерой для контроля и прекращения пандемии SARS-CoV-2 [9]. Кроме того, появление мутантов SARS-CoV-2 ставит новые задачи перед существующими вакцинами-кандидатами и контролем над эпидемией [10]. Поэтому в нынешней эпидемической ситуации срочно необходимы действенные вакцины, эффективные и против мутантов SARS-CoV-2.

Связывание антигена с Fc-областью иммуноглобулина значительно увеличивает время полужизни антигена, а Fc-область иммуноглобулина может связываться с Fc-рецепторами на поверхности антигенпрезентирующих клеток, способствуя процессингу и презентации антигена антигенпрезентирующими клетками [11-13]. Интерферон I типа обладает многими биологическими активностями в качестве противовирусного цитокина, включая стимуляцию иммунных клеток [14]. IFN α может сильно индуцировать дифференцировку и активацию DC-клеток человека [15]. Воздействуя на незрелые DC, интерферон I типа может способствовать экспрессии молекул MHC и костимулирующих молекул на поверхности DC клеток, таких как MHC класса I, CD80 и CD86, тем самым повышая способность DC активировать T-клетки [16-18]. Сообщалось, что интерферон I типа может повышать антигенпрезентирующую способность DC после инфицирования вирусом коровьей оспы и вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) [19-21]. Кроме того, интерферон I типа может способствовать миграции DC в лимфатические узлы за счет усиления экспрессии хемокиновых рецепторов после воздействия на DC, способствуя, таким образом, активации T-клеток [22, 23]. В последнее время все больше и больше исследований показывают, что интерферон I типа можно использовать в качестве

иммуноадьюванта. В исследовании Le Bon et al. было показано, что, когда мышью иммунизировали слабым иммуногеном, интерферон I типа проявлял сильный иммуноадьювантный эффект у мышей и индуцировал долгоживущие антитела и иммунную память [24], также автором было обнаружено, что основными клеточными популяциями, в которых интерферон I типа проявлял свой эффект, были DC-клетки. В то же время антитела используются для направленной доставки вакцин к DC, чтобы стимулировать активацию и функции кросс-презентации DC, что еще больше повысит активность и эффективность вакцин.

Что касается настоящего изобретения, необходимо обеспечить вакцинную платформу, которая усиливает ответ на вирусы, бактерии или опухолевые антигены.

Сущность изобретения

Вакцины являются эффективным способом предотвращения и контроля крупных вспышек инфекционных заболеваний. Существуют различные типы вакцин, одна из которых представляет собой субъединичные белковые вакцины. В целом, простые белковые субъединичные вакцины обычно обладают низкой иммуногенностью, что часто ограничивает использование белковых субъединичных вакцин. Таким образом, срочно необходима универсальная платформа белковых субъединичных вакцин. Учитывая влияние Fc-области иммуноглобулина и интерферона I типа на иммунную систему, авторы изобретения предлагают вакцинную платформу на основе слитого белка интерферон альфа - вирусный, бактериальный или опухолевый антиген - Fc-область иммуноглобулина, для усиления иммунного ответа на вирусы, бактерии или опухолевые антигены. Настоящее изобретение относится к вакцинной платформе интерферон I типа-белковый антиген-Fc иммуноглобулина, где интерферон I типа может способствовать созреванию и миграции антигенпрезентирующих клеток для лучшего выполнения роли презентации антигена и активации T-клеток. С другой стороны, Fc-фрагмент вакцинной платформы может связываться с Fc-рецепторами на поверхности антигенпрезентирующих клеток для усиления захвата антигенов антигенпрезентирующими клетками, еще более способствуя таким образом осуществлению функций антигенпрезентирующими клетками. Авторы настоящего изобретения предполагают, что слияние эпитопов хелперных Th-клеток может еще более усилить эффект вакцины, включающей интерферон I типа - белковый антиген - Fc иммуноглобулина, на иммунный ответ, и таким образом, эпитоп хелперной Th-клетки является важным элементом вакцины. Авторы настоящего изобретения предполагают, что анти-PD-L1 и другие антитела можно использовать для замены Fc, и вакцина может доставляться к DC, чтобы стимулировать активацию и функции кросс-презентации DC, что еще больше повысит активность и эффективность вакцины. В качестве новой вакцинной платформы вакцинную платформу по настоящему изобретению можно использовать в качестве профилактической и терапевтической вакцины против заболеваний, таких как вирусные инфекции, бактериальные инфекции или опухоли.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вакцине, включающей слитый белок, содержащий интерферон-целевой антиген-Fc-область

иммуноглобулина (или антитело) (и дополнительный Th-эпитоп). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к применению слитого белка, содержащего интерферон-целевой антиген-Fc-область иммуноглобулина (или антитело) (и дополнительный Th-эпитоп) для получения профилактических или терапевтических композиций или наборов (таких как лекарственные средства или вакцинные композиции, или содержащие их наборы). Вакцину по настоящему изобретению можно получить при помощи эукариотических клеточных систем экспрессии и вводить подкожным/внутримышечным или интраназальным или другим путем иммунизации. Что касается слитого полипептида по настоящему изобретению, антитело (сокращенно Ab) в качестве структурной единицы конкретно не ограничивается и может включать, например, полное антитело или фрагмент антитела, такой как тяжелая цепь и легкая цепь антитела, или одноцепочечное антитело, и это могут быть антитела для целенаправленной активации DC, включая анти-PD-L1, анти-DEC205, анти-CD80/86 и другие антитела.

В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, описанный в настоящей заявке, конкретно не ограничивается и может представлять собой любой подходящий антиген. В некоторых вариантах осуществления целевые антигены, описанные в настоящей заявке, могут представлять собой, например, опухолевые антигены и/или антигены патогенов (например, вирусные или бактериальные антигены). В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, описанный в настоящей заявке, может представлять собой, например, опухолевый антиген, такой как белковая молекула, экспрессируемая на высоком уровне опухолевыми клетками, например, рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2/neu), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR).

В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, используемый в вакцине по настоящему изобретению, может представлять собой, например, мутантный целевой антиген, который является отличным от дикого типа. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, описанный в настоящей заявке, может представлять собой, например, мутанты опухолевых антигенов и/или антигенов патогенов, например вирусных или бактериальных антигенов. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген может представлять собой, например, полноразмерный или S1 область S белка вируса SARS-COV-2, например, целевой антиген может представлять собой антиген, показанный в SEQ ID NO.76 или SEQ ID NO.77. В настоящем изобретении целевой антиген дикого типа означает вирусы или другие инфекционные агенты, кодируемые генами дикого типа, или иммуногенные белки, экспрессируемые опухолями (ген дикого типа относится к наиболее распространенному аллелю в природе, и часто используется в качестве контрольного стандартного гена в биологических экспериментах), например, спайковый белок (S белок), полученный из исходного штамма SARS-CoV-2 дикого типа. В настоящем изобретении мутантный целевой антиген (мутант) относится к мутантным вирусным белкам, экспрессируемым мутантными вирусными штаммами и кодируемым мутантными генами, происходящими из генов дикого типа, например, точечные мутации S белка в

различных мутантных SARS-CoV-2, которые были обнаружены, включают: делецию 69-70, делецию Y144, делецию 242-244, мутацию L18F, D80A, D215, R246I в области NTD, и мутацию K417, E484, N501Y, мутацию L452R, мутацию T478K, мутацию D614G, H655Y в области RBD. Например, эти точечные мутации существуют в разных комбинациях в британских мутантных штаммах SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Альфа), южноафриканских мутантных штаммах B.1.351 (Бета), бразильских мутантных штаммах P1 (Гамма), индийских мутантных штаммах B.1.617, B.1.617.1 (Каппа), B.1.617.2 (Дельта), B.1.617.3, калифорнийских мутантных штаммах B.1.429 и других мутантных штаммах. В некоторых вариантах осуществления мутантные целевые антигены могут включать, например, естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечение, искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечение, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образованные мутациями, при этом целевой антиген может представлять собой опухолевый антиген, антиген патогена, такой как вирусный (например, SARS-COV-2) или бактериальный антиген. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, используемый в вакцине по настоящему изобретению, представляет собой мутантный вирусный антиген, например, мутантный вирусный антиген может представлять собой мутант SARS-COV-2, включающий, например, естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечение, искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечение, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образованные мутациями, полученные из белка SARS-COV-2 (такие как один или более из S белка, N белка, М белка, Е белка); например, мутантный вирусный антиген может представлять собой мутант полноразмерного S белка, S1 области и RBD области; например, мутантный вирусный антиген может включать одну или несколько из следующих мутаций в S белке SARS-COV-2: делеция 69-70, делеция Y144, делеция 242-244, мутация L18F, D80A, D215, R246I в области NTD, мутация K417, E484, N501Y, мутация L452R, мутация T478K, мутация D614G, H655Y в области RBD; например, мутантный вирусный антиген может включать мутации, присутствующие в британском мутантном штамме B.1.1.7 (Альфа), южноафриканском мутантном штамме B.1.351 (Бета) и бразильском мутантном штамме P1 (Гамма), индийских мутантах B.1.617, B.1.617.1 (Каппа), B.1.617.2 (Дельта), B.1.617.3 и калифорнийском мутанте B.1.429; например, мутантный вирусный антиген может содержать мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80 и SEQ ID NO.81; мутантный вирусный антиген может содержать мутант, включающий последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82, SEQ ID NO.83 и SEQ ID NO.84. В настоящей заявке, если определено не указано иное или явно не ограничивается контекстом, целевой антиген в настоящем изобретении, как правило, включает целевые антигены дикого типа и мутантные целевые антигены.

Целью настоящего изобретения является получение вакцинной платформы, которая включает интерферон (IFN) и опухолевый, бактериальный или вирусный антиген (антиген

вируса гепатита В Pres1, антиген RBD SARS-COV2, антиген HA вируса гриппа, антиген HPV E7 папилломавируса человека, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) или пептидный фрагмент, антиген gE вируса опоясывающего герпеса (VZV), антиген вируса Эпштейна-Барр (EBV) EBNA1/LMP2/gp350, антиген gD вируса простого герпеса 2 (HSV-2), антиген gp120 ВИЧ - Fc-область иммуноглобулина (или антитело) (и дополнительный Th-эпитоп). Слитый белок может представлять собой гомодимерный или гетеродимерный белок. В случае, когда слитый белок находится в форме димера, интерферон, целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина (или антитело Ab) в качестве структурных единиц могут существовать в первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи, и присутствие каждой структурной единицы конкретно не ограничивается, например, они все могут существовать в одной цепи, или любые одна или несколько структурных единиц могут существовать в одной цепи, тогда как другие одна или несколько структурных единиц могут существовать в другой цепи.

Интерферон по настоящему изобретению можно выбрать из интерферона I типа, интерферона II типа и интерферона III типа, такого как IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28a), IFN- λ (IL-28b) и IFN- ω ; IFN может быть получен от человека или мыши; предпочтителен интерферон I типа IFN- α (SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22).

Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению можно выбрать из аминокислотных последовательностей константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4/или IgM, предпочтительно IgG1 (SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.24).

Слитый полипептид по настоящему изобретению также необязательно может включать один или более эпитопов хелперных Th-клеток и/или связывающих фрагментов (линкеров). Например, когда слитый белок находится в форме димера, слитый белок также необязательно включает один или более эпитопов хелперных Th-клеток и/или связывающих фрагментов в любой одной или двух цепях гомодимера или гетеродимера (т.е. в первой полипептидной цепи и/или во второй полипептидной цепи). Как известно специалистам в данной области, различные структурные единицы слитого белка могут соединяться подходящими связывающими фрагментами (линкерами). Связывающие фрагменты, которые можно использовать в вакцине по настоящему изобретению, конкретно не ограничиваются и могут быть любыми подходящими пептидными фрагментами, известными в данной области техники. Связывающие фрагменты каждой структурной единицы в настоящем изобретении могут представлять собой гибкие полипептидные последовательности и могут быть связывающими фрагментами 1 и 2, например, как показано в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO.4 и SEQ ID NO.25.

N-концевая часть полипептидной последовательности, состоящей из каждой структурной единицы, в настоящем изобретении содержит соответствующий сигнальный пептид, способный стимулировать секрецию белка, например показанный в аминокислотной последовательности SEQ ID NO.5.

Предпочтительные антигены, описанные в настоящем изобретении, включают

антиген Pres1 гепатита В, включая подтип ad (SEQ ID NO.6), подтип ay (SEQ ID NO.26), антиген HBsAg HBV (различные подтипы и пептидные фрагменты), включая подтип adr (SEQ ID NO.7), подтип adw (SEQ ID NO.27), подтип ayw (SEQ ID NO.28), антиген RBD SARS-COV2 (SEQ ID NO.8), антиген HA вируса гриппа (SEQ ID NO.9), антиген E7 HPV (SEQ ID NO.10); антиген вируса герпеса VZV-gE (SEQ ID NO.91), антиген EBV-gp350 (SEQ ID NO.92), антиген HSV-2-gD (SEQ ID NO.93).

Гомодимерный белок, описанный в настоящем изобретении, включает первый полипептид и второй полипептид, и первый полипептид и второй полипептид полностью идентичны. Порядок расположения элементов от N-конца к C-концу в первом полипептиде и втором полипептиде является следующим: IFN - опухолевый или вирусный антиген (антиген Pres1 гепатита В, антиген SARS-COV2 RBD, антиген HA вируса гриппа, антиген HPV E7, антиген HBsAg, антиген VZV-gE, EBV EBNA1/LMP2/gp350, антиген HSV-2-gD, антиген gp120 ВИЧ) - Fc-область иммуноглобулина; или полипептид, содержащий Pan эпитоп. Гомодимерный белок по настоящему изобретению включает последовательности, показанные в SEQ ID NO.11, 12, 13, 14, 29, 30, 31, 32, 38, 39, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 59, 58, 65, 66, 67 или 68.

Гетеродимер по настоящему изобретению включает первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид и второй полипептид не являются идентичными; первый полипептид, от C-конца к N-концу, представляет собой соответственно IFN - Fc-область иммуноглобулина и включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO.15, 33, 42, 51, 60, или 69; второй полипептид, от C-конца к N-концу, представляет собой, соответственно, опухолевый или вирусный антиген (антиген Pres1 гепатита В, антиген SARS-COV2 RBD, антиген HA вируса гриппа, антиген HPV E7, антиген VZV-gE, EBV EBNA1/LMP2/gp350, антиген HSV-2-gD, антиген gp120 ВИЧ) - Fc-область иммуноглобулина и включает аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 55, 61, 62, 63, 64, 70, 71, 72 или 73.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей описанную выше вакцинную платформу IFN - опухолевый или вирусный антиген (антиген Pres1 гепатита В, антиген HBsAg или пептид, антиген SARS-COV2 RBD, антиген HA вируса гриппа, антиген HPV E7, антиген VZV-gE, EBV EBNA1/LMP2/gp350, антиген HSV-2-gD, антиген gp120 ВИЧ) - Fc иммуноглобулина.

Настоящее изобретение также относится к нуклеотидному фрагменту, кодирующему вакцинную платформу и слитый белок.

Настоящее изобретение также относится к способу получения слитого белка или вакцинной платформы, например, способ получения включает следующие стадии:

(1) Конструируют вектор экспрессии, включающий ген, кодирующий слитый белок или вакцинную платформу; предпочтительно вектор экспрессии представляет собой вектор экспрессии pEE12.4;

(2) Конструируют клетку-хозяин, включающую вектор экспрессии, путем транзientной трансфекции; предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой клетку

293F;

(3) Клетки-хозяева культивируют и собирают клеточный супернатант;

(4) Слитый белок или вакцинную платформу очищают аффинной колоночной хроматографией с белком A/G.

Настоящее изобретение также включает применение вакцинной платформы; вакцинную платформу можно использовать в качестве профилактической вакцины против гепатита В, терапевтической вакцины против гепатита В, профилактической вакцины против гриппа, профилактической вакцины против SARA-COV2, гриппа, HPV, VZV, EBV, HSV-2 и ВИЧ, а также профилактической вакцины против HPV и EBV-связанных опухолей.

Настоящее изобретение включает адъюванты, используемые в вакцинной платформе, при этом адъюванты включают алюминиевый адъювант (квасцы), MPLA лиганд активатора Toll-подобного рецептора 4, лиганд Toll-подобного рецептора 9, M59, олигодезоксинуклеотиды (CpG-ODN) и адъювант Фрейнда.

Настоящее изобретение включает клиническое применение вакцинной платформы в качестве терапевтической вакцины против HBV в комбинации с вакциной на основе белка оболочки HBsAg вируса гепатита В в лечении хронического вирусного гепатита В.

Настоящее изобретение включает клиническое применение вакцинной платформы в качестве терапевтической вакцины против HBV в комбинации с нуклеозидными или нуклеотидными аналогами в лечении хронического вирусного гепатита В.

Настоящее изобретение включает совместное применение вакцинной платформы в качестве профилактической или терапевтической вакцины против HBV, гриппа, SARS-COV2, HPV, VZV, EBV, HSV-2 и ВИЧ в комбинации с противовирусными лекарственными средствами и другими терапиями; в качестве профилактической или терапевтической вакцины против HBV, HPV и связанных с EBV опухолей в комбинации с противовирусными и противоопухолевыми лекарственными средствами и терапиями.

Настоящее изобретение включает мультивалентную комбинированную вакцину, состоящую из вакцинной платформы и других противовирусных, противопатогенных или противоопухолевых вакцин.

Любую вакцину на основе слитого белка, включающую вакцинную платформу по настоящему изобретению, можно вводить последовательно или одновременно с аденовирусной вакциной, мРНК-вакциной, инактивированной вакциной или ДНК-вакциной против того же вируса, патогена или опухоли.

Настоящее изобретение включает полноразмерную последовательность и любую усеченную последовательность антигена вакцинной платформы, например, SEQ ID NO.76, SEQ ID NO.77, SEQ ID NO.78.

Настоящее изобретение включает любые возможные мутанты указанного антигена вакцины на основе слитого белка, включая естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/усечение, любую комбинацию естественных мутаций, подтипы, образованные мутациями, и мутантные последовательности, включающие искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/усечение, сконструированные для усиления эффекта

вакцины, такие как SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82, SEQ ID NO. 83, SEQ ID NO.84.

Настоящее изобретение относится к мультивалентной комбинированной вакцине, включающей любую вакцину по настоящему изобретению в качестве компонента такой вакцины и другую вакцину по настоящему изобретению или другие вакцины, отличные от вакцины по настоящему изобретению, такие как другие противовирусные, или противопатогенные, или противоопухолевые вакцины, например мультивалентную вакцину, включающую вакцину на основе слитого белка SARS-CoV-2 по настоящему изобретению в комбинации с вакциной против гриппа или другими вакцинами; например, любую вакцину по настоящему изобретению и аденовирусную вакцину, или мРНК-вакцину, или инактивированную вакцину, или ДНК-вакцину против того же вируса, патогена или опухоли можно вводить последовательно или одновременно; например, вакцину на основе слитого белка SARS-CoV-2 можно вводить с аденовирусной вакциной, или мРНК-вакциной, или инактивированной вакциной, или ДНК-вакциной против SARS-COV-2 последовательно или одновременно; например, последовательность для иммунизации может быть следующей: 1) сначала иммунизация вакциной на основе слитого белка SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, а затем иммунизация аденовирусной вакциной, или мРНК-вакциной, или инактивированной вакциной, или ДНК-вакциной против SARS-COV-2; 2) сначала иммунизация аденовирусной вакциной, или мРНК-вакциной, или инактивированной вакциной или ДНК-вакциной против SARS-COV-2, с последующей иммунизацией вакциной на основе слитого белка SARS-CoV-2; 3) вакцину на основе слитого белка SARS-CoV-2 и аденовирусную вакцину, или мРНК-вакцину, или инактивированную вакцину, или ДНК-вакцину вводят одновременно. Как известно в данной области техники, в случае использования в комбинации вакцины можно подготовить в виде удобного набора.

Настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, следующие преимущества по сравнению с предшествующим уровнем техники:

1. Антигены вакцинной платформы IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемые настоящим изобретением, могут варьироваться в различных компонентах, будь то опухоль-ассоциированные антигены или вирус-специфические антигены, что повышает гибкость вакцинной платформы, а также область применения вакцинной платформы.

2. В вакцинной платформе IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемой настоящим изобретением, интерферон (IFN) может усиливать миграцию и созревание антигенпрезентирующих клеток и повышать экспрессию костимулирующих факторов, тем самым способствуя презентации антигенов Т-клеткам; при этом Fc-область (или антитело) в вакцинной платформе, с одной стороны, увеличивает молекулярную массу антигена и тем самым увеличивает время его полужизни, а с другой стороны, Fc-область (или антитело) может связываться с Fc-рецепторами на поверхности антигенпрезентирующих клеток и способствовать процессингу и презентации

антигенов антигенпрезентирующими клетками, способствуя тем самым возникновению иммунных ответов.

3. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, экспрессируется эукариотической системой экспрессии на основе клеток НЕК293, и белки, экспрессируемые клетками НЕК293, ближе к молекулам природного белка либо по молекулярной структуре, либо по физико-химическим характеристикам и модификации белков и биологическим функциям белков.

4. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, может быть в форме гомодимера или гетеродимера и имеет лучший выбор для различных антигенов.

5. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, может активировать DC для усиления кросс-презентации DC и генерирования сильных В- и Т-клеточных иммунных ответов путем слияния эпитопов хелперных Th-клеток, таких как Pan эпитопы, использования нацеленных на DC антител, таких как анти-PD-L1, и добавления различных адъювантов для стимуляции иммунных ответов.

6. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген- Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, имеет широкий спектр применений и может использоваться не только в качестве профилактической вакцины, но также и в качестве терапевтической вакцины.

7. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, может использоваться не только отдельно, но также может использоваться в качестве терапевтической вакцины в комбинации с существующими коммерческими HBsAg-вакцинами и нуклеозидными/нуклеотидными аналогами.

8. Вакцинную платформу, обеспечиваемую настоящим изобретением, можно использовать в комбинации с другими противовирусными, противопатогенными или противоопухолевыми вакцинами для получения мультивалентной вакцины.

9. Любую вакцину на основе слитого белка в вакцинной платформе по настоящему изобретению можно вводить вместе с аденовирусной вакциной, мРНК-вакциной, инактивированной вакциной или ДНК-вакциной против того же вируса, патогена или опухоли последовательно или одновременно.

10. Настоящее изобретение включает полноразмерную последовательность и любую усеченную последовательность антигена вакцинной платформы.

11. Любые возможные мутанты антигена вакцинной платформы, представленные в настоящем изобретении, включают естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечение, любую комбинацию естественных точечных мутаций, подтипы, генерируемые мутациями, и мутантные последовательности, включающие искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с

добавлением/усечением, сконструированные с целью усиления эффекта вакцины.

Последовательности, используемые в настоящем изобретении:

1. Последовательности индивидуальных компонентов:

SEQ ID NO.1: Аминокислотная последовательность мышинового mIFN α 4 (mIFN α)
 CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRLDTQQILNLFSTKDLSATWLNATLLDSFCNDLHQQNLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSKCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKE

SEQ ID NO.21: Аминокислотная последовательность человеческого IFN α 2 (hIFN α)
 CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQNLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

SEQ ID NO.22: Аминокислотная последовательность человеческого мутантного IFN α 2 (Q124R) (hmIFN α)

CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQNLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

SEQ ID NO.2: Аминокислотная последовательность человеческого IgG1-Fc
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 HV

SEQ ID No.23: Fc-hole гетеродимера

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No.24: Fc-knob гетеродимера

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.3: Аминокислотная последовательность Т-хелперного эпитопа Pan HLA
 DR-связывающего эпитопа (PADER)

AKFVAAWTLKAAA

SEQ ID NO.4: Аминокислотная последовательность Линкера 1:

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO.25: Аминокислотная последовательность Линкера 2:

GSGSGS

SEQ ID NO.5: Аминокислотная последовательность сигнального пептида:

MARLCAFLMILVMMSYYWSACSLG

SEQ ID NO.6: Аминокислотная последовательность HBV Pres1 (подтип ad)

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWP
AANQVGVGAFGPGLTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRD
SHPQA

SEQ ID NO.26: Аминокислотная последовательность HBV Pres1 (подтип ay)

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
GLGFTPPHGGLLGWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQA

SEQ ID NO.7: Аминокислотная последовательность HBV HBsAg (подтип adr)

MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSP
TSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTG
PCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFSWL SLLVPF
VQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLLPIFFCLWVYI

SEQ ID NO.27: Аминокислотная последовательность HBV HBsAg (подтип adw)

MENITSGLLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLSFLGEAPVCLGQNSQSP
TRNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTG
PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFSWL SLLVPF
VQWFVGLSPTVWLSAIWMIWYWGPSLYSIVCPFTPLLQIFCCLWVFI

SEQ ID NO.28: Аминокислотная последовательность HBV HBsAg (подтип ayw)

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQSSQSP
TSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTG
PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFSWL SLLVP
FVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

SEQ ID NO.8: Аминокислотная последовательность SARS-CoV-2 RBD

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO.9: Аминокислотная последовательность HA гриппа:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGK
CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLV
LWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWT
LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSR

SEQ ID NO.10: Аминокислотная последовательность антигена HPV-E7

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP

2. Последовательности в составе содержащей мышинный IFN вакцины mIFN α -
антиген-Fc:

гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRTMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQA
 EPDRAHYNIVTFCKCDSLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVLSVHEALHNHYTQKSLSLSPGKHV

SEQ ID NO.15: Аминокислотная последовательность первой цепи mIFN α -Fc-hole в гетеродимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

SEQ ID NO.16: Аминокислотная последовательность второй цепи Pres1-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -Pres1-Fc

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
 GLGFTPPHGLLGWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.17: Аминокислотная последовательность второй цепи RBD (SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -RBD (SARA-CoV-2)-Fc

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.18: Аминокислотная последовательность второй цепи HA-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -HA-Fc

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGK
 CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
 FPKESSWPNHNTNGVTAACSHHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLV
 LWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWT
 LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
 NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.19: Аминокислотная последовательность второй цепи E7-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -E7(HPV)-Fc

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHNYNI
 VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRLWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3. Последовательности в составе содержащей мышинный IFN и Pan эпитоп вакцины IFN α -Pan-антиген-Fc:

SEQ ID NO.29: Аминокислотная последовательность mIFN α -Pan-Pres1-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRITYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPD
 WDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQILQTL PANPPPASTNRQ
 TGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTP EVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.30: Аминокислотная последовательность mIFN α -Pan-RBD(SARS-CoV-2)-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRITYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
 YAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQR
 IAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDI

STEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP
 KKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO.31: Аминокислотная последовательность mIFN α -Pan-HA-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRITYFHRITVYLRKKKHSKCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN
 LLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY
 PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTE
 KEGSYPKLKN SYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRF
 TPEIAERPKVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNA
 SMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFED
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.32: Аминокислотная последовательность mIFN α -Pan-E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRITYFHRITVYLRKKKHSKCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLND
 SSEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLR LCVQSTHVDIRTLEDLLMGT LGIV
 CPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.33: Аминокислотная последовательность первой цепи mIFN α -Fc-hole в гетеродимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRITYFHRITVYLRKKKHSKCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 34: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-Pres1-Fc-knob в гетеродимере mIFN-Pan-Pres1-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGR
QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.35: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-RBD (SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -Pan-RBD (SARA-CoV-2)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLYNASFSSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGSSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
LSPGK

SEQ ID NO.36: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-HA-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -Pan-HA-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED
SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF
IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
YPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIA
ERPQVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
CNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRSACLKRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.37: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-E7-Fc-knob в гетеродимере mIFN α -Pan-E7 (HPV)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICS
QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

4. Последовательности в составе содержащей человеческий IFN вакцины hIFN α -антиген-Fc:

SEQ ID NO.38: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pres1-Fc в гомодимере
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA
GAFGLGFTPPHGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAF
EDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.39: Аминокислотная последовательность hIFN α -RBD (SARS-CoV-2)-Fc
в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYN
SASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT
GCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCY
FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.40: Аминокислотная последовательность hIFN α -HA-Fc в гомодимере
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQ
LGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFE
RFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKE
VLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYY
WTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLP
YQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQ

GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.41: Аминокислотная последовательность hIFN α -E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
HYNIVTFCKCDSTLRCLVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.42: Аминокислотная последовательность первой цепи hIFN-Fc-hole в гетеродимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
GSGGGSGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO.43: Аминокислотная последовательность второй цепи Pres1-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -Pres1-Fc

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
GLGFTPPHGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LSDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.44: Аминокислотная последовательность второй цепи RBD(SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -RBD (SARA-CoV-2)-Fc

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.45: Аминокислотная последовательность второй цепи HA-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -HA-Fc

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGK
CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESSWPNHNTNGVTAACSHHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSPKLNKSYVNKKGKEVLV
LWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWT
LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.46: Аминокислотная последовательность второй цепи E7(HPV)-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -E7 (HPV)-Fc

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHNYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5. Последовательности в составе содержащей человеческий IFN и Pan эпитоп вакцины IFN α -Pan-антиген-Fc:

SEQ ID NO.47: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pan-Pres1-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
KAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKV
GAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQ
AFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.48: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pan-RBD (SARS-CoV-2)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
KAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL
YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPD

DFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFED
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.49: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pan-HA-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAP
 LQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSS
 FERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKG
 KEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGR MN
 YYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSS
 LPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.50: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pan-E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPD
 RAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.51: Аминокислотная последовательность первой цепи hIFN α -Fc-hole в гетеродимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO.52: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-Pres1-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -Pan-Pres1-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGR
QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.53: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-RBD (SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -Pan-RBD (SARA-CoV-2)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
LSPGK

SEQ ID NO.54: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-HA-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -Pan-HA-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLD
SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF
IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
YPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIA
ERPQVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
CNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.55: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-HA-Fc-knob в гетеродимере hIFN α -Pan-E7(HPV)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICS
QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

6. Последовательности в составе содержащей человеческий мутантный IFN вакцины
hmIFN α -Pan-антиген-Fc:

SEQ ID NO.56: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pres1-Fc в гомодимере
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVVTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA
GAFGLGFTPPHGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAF
EDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.57: Аминокислотная последовательность hmIFN α -RBD (SARS-CoV-2)-
Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVVTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYN
SASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT
GCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCY
FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.58: Аминокислотная последовательность hmIFN α -HA-Fc в гомодимере
CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVVTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQ
LGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFE
RFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKE
VLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYY
WTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLP
YQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQ

GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.59: Аминокислотная последовательность hmIFN α -E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTEL YQQNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
SILAVRKYFRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
HYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.60: Аминокислотная последовательность первой цепи hmIFN-Fc-hole в гетеродимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTEL YQQNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
SILAVRKYFRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGGG
GSGGGGSGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 61: Аминокислотная последовательность второй цепи Pres1-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -Pres1-Fc

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
GLGFTPPHGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.62: Аминокислотная последовательность второй цепи RBD(SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -RBD (SARA-CoV-2)-Fc

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.63: Аминокислотная последовательность второй цепи HA-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -HA-Fc

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGK
CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESSWPNHNTNGVTAACSHHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSPKLNKSYVNKKGKEVLV
LWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWT
LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTK CQTPLGAINSSLPYQ
NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.64: Аминокислотная последовательность второй цепи HA-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -E7 (HPV)-Fc

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHNYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

7. Последовательности в составе содержащей человеческий мутантный IFN и Pan эпитоп вакцины hmIFN α -Pan эпитоп-антиген-Fc:

SEQ ID NO.65: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pan-Pres1-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQE EFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
KAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKV
GAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQ
AFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.66: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pan-RBD(SARS-CoV-2)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQE EFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
KAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL
YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPD

DFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFED
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.67: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pan-HA-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCRLKGIAP
 LQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSS
 FERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLKNSYVNKKG
 KEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGR MN
 YYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSS
 LPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.68: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pan-E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPD
 RAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.69: Аминокислотная последовательность первой цепи hmIFN α 4-Fc-hole в гетеродимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTEL YQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRD KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO.70: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-Pres1-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -Pan-Pres1-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGR
QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.71: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-RBD(SARS-CoV-2)-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -Pan-RBD (SARA-CoV-2)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
LSPGK

SEQ ID NO.72: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-HA-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -Pan-HA-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED
SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF
IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
YPKLKNSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIA
ERPQVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
CNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.73: Аминокислотная последовательность второй цепи Pan-HA-Fc-knob в гетеродимере hmIFN α -Pan-E7 (HPV)-Fc

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICS
QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

8. Последовательности антител, используемых для замены Fc

SEQ ID NO.20: Аминокислотная последовательность ScFv (PD-L1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVA
WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY
WGQGTLLTVSA

SEQ ID NO.74: Аминокислотная последовательность Анти-PD-L1 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPY
GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQ
TLVTVSA

SEQ ID NO.75: Аминокислотная последовательность Анти-PD-L1 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

9. Последовательности других вирусных антигенов

SEQ ID NO.76: Аминокислотная последовательность спайкового белка SARS-CoV-

2

VNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNAITNVVIKV
CEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN
LREFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT
PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVE
KGIYQTSNFRVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLY
NSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDF
TGCVIAWNSNLDLSDKVGGNVNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC
YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYPYRNVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGL
TGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI
GAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEILP
VSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVK
QIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARD
LICAQKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFN
GIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQD
VVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQ
QLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVV
PAQEKNTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCD
VVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNE
VAKNLNESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGC

CSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

SEQ ID NO. 77: Аминокислотная последовательность белка S1 SARS-CoV-2

VNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIKV
CEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN
LREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLT
PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVE
KGIYQTSNFRVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLY
NSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDF
TGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC
YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGL
TGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI
GAGICASYQTQTNSPRRAR

SEQ ID NO. 78: Аминокислотная последовательность белка RBD исходного штамма SARS-CoV-2

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 79: Аминокислотная последовательность белка RBD британского мутантного штамма SARS-CoV-2 (B.1.1.7, Альфа)

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTYGVGYQPYPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 80: Аминокислотная последовательность белка RBD южноафриканского мутантного штамма SARS-CoV-2 (B.1.351, Бета)

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNICYFP
LQSYGFQPTYGVGYQPYPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 81: Аминокислотная последовательность белка RBD бразильского мутантного штамма SARS-CoV-2 (P.1)

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGCV
IAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNICYFPL
QSYGFQPTYGVGYQPYPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 82: Аминокислотная последовательность белка RBD калифорнийского мутантного штамма SARS-CoV-2 (B.1.429)

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 83: Аминокислотная последовательность белка RBD индийских B.1.617, B.1.617.1 (Каппа) и B.1.617.3 мутантных штаммов SARS-CoV-2 (B.1.429)

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVQGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO. 84: Аминокислотная последовательность белка RBD индийского мутантного штамма второго поколения B.1.617.2 (Дельта) SARS-CoV-2

RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLYNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

10. Последовательности других опухолевых антигенов:

Аминокислотные последовательности внеклеточных доменов II, III и IV Her2 мыши, используемые в Примерах:

SEQ ID NO. 85 Her2-внеклеточный домен 2 мыши:

SRACPPCAPACKDNHCWGESPEDCQILGTICTSGCARCKGRLPTDCCHEQCAA
 GCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMHNPEGRYTFGASCVTTCPY
 NYLSTEVGSCTLVCPNNEVTAEDGTQRCEKCSKPC

SEQ ID NO. 86 Her2-внеклеточный домен 3 мыши:

GCKKIFGSLAFLPESFDGDPSSGIAPLRPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLRLD
 SVFQNLRIIRGRILHDGAYSLTLQGLGIHSLGLRSLRELGSGLALIHNAHLCFVHTVPWD
 QLF

SEQ ID NO. 87 Her2-внеклеточный домен 4 мыши:

VCNSLCAHGHCWGPPTQCVNCSHFLRGQECVEECRVWKGLPREYVSDKRCLP
 CHPECQPQNSSETCFGSEADQCAACAHYKDSSSCVARCPSGVKPDLSYMPIWKYPDEEG
 ICQPCPINCTHSCVDLDERGCP

Аминокислотные последовательности внеклеточных доменов II, III и IV Her2 человека, используемые в Примерах:

SEQ ID NO. 88 Her2-внеклеточный домен 2 человека:

SRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCA
 AGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPNNEVTAEDGTQRCEKCSKPC

SEQ ID NO. 89 Her2-внеклеточный домен 3 человека:

GCKKIFGSLAFLPESFDGPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLD
 SVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPW

SEQ ID NO. 90 Her2-внеклеточный домен 4 человека:

CHQLCARGHCWGGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPC
HPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDL SYMPIWKFPDEEG
ACQPCPINCTHSCVDLDDKGC

11. Последовательности антигенов вируса герпеса, используемые в Примерах:

SEQ ID NO. 91 VZV оболочечный гликопротеин E (aa 31-538)

SVLRYDDFHTDEDKLDNTNSVYEPYHSDHAESSWVNRGESSRKA YDHNSPYIW
PRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGD
DRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETW
SFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCFQDVVVDVCAENTKEDQLAEISYRFQGGKEAD
QPWIVVNTSTLFDLELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLVVYIWNMRGSDGTSTYATFLVT
WKGDEKTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNYHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLLL
EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCHEH
ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPELSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTV
VSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPKEITPVNPGTSPLLR

SEQ ID NO. 92 EBV оболочечный гликопротеин GP350 (aa 1-425)

MEAALLVCQYTIQSLIHLTGEDPGFFNVEIPEFFPYTCNVCTADVNTINFDVGG
KKHQLDLDFGQLTPHTKAVYQPRGAFGGSENATNLFLELLGAGELALTMRSKKLPINV
TTGEEQQVSLESVDVYFQDVFGTMWCHHAEMQNPVYLIPETVPYIKWDNCNSTNITAV
VRAQGLDVTLP LSLPTSAQDSNFSVKTQMLGNEIDIECIMEDGEISQVLPGDNKFNITCSG
YESHVPSGGILTSTSPVVTPIPGTYAYSLRLTPRPVSRFLGNNSILYVFYSGNGPKASGG
DYCIQSNIVFSDEIPASQDMPTNTTDITYVGDNATYSVPMVTSEDANSPNVTVTAFWAW
PNNTETDFKCKWTLTSGTPSGCENISGAFASNRTFDITVSGLTAPKTLIITRTATNATTT
THKVIFSKAP

SEQ ID NO. 93 HSV-2 оболочечный гликопротеин gD (aa 26-339)

KYALADPSLKMADPNRFRGKNLPVLDRLTDPGPKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPIT
VYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVME
YTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDW
TEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSKAYQQGVTVD SIGMLPRFIPENQRTVALY
SLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
IPSIQDVAPHHAPAAPSNP

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гомодимера с расположением в следующем порядке: интерферон-связывающий фрагмент 1-целевой антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело);

Фиг. 2 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий фрагмент 1-IgG1-hole и целевой антиген-IgG1-knob (или антитело);

Фиг. 3 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий

фрагмент 1-IgG1-knob и целевой белок-IgG1-hole (или антитело);

Фиг. 4 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гомодимера с расположением в следующем порядке: интерферон-связывающий фрагмент 1-Т-хелперный эпитоп-связывающий фрагмент 2-целевой антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело);

Фиг. 5 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий фрагмент 1-IgG1-hole и Т-хелперный эпитоп-связывающий фрагмент 2-целевой антиген-IgG1-knob (или антитело) ;

Фиг. 6 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий фрагмент 1-IgG1-knob и Т-хелперный эпитоп-связывающий фрагмент 2-целевой антиген-IgG1-hole (или антитело).

Фиг. 7 представляет картину SDS-PAGE электрофореза неденатурированных белков Pres1-Fc и IFN-Pres1-Fc.

Фиг. 8 показывает, что по сравнению со свободным preS1 слитые белки preS1-Fc и IFN-preS1-Fc могли существенно усиливать иммунитет антигенных молекул и способствовать выработке нейтрализующих антител широкого спектра действия. (а) Мышей C57/BL6 (n=8/группа) подкожно иммунизировали свободными белками Pres1 гепатита В, Pres1-Fc и IFN α -Pres1-Fc и определяли уровень Pres1-специфических антител в сыворотке крови методом ELISA в указанное время. (b) Мышам (n=4), стабильно несущим три генотипа HBV, внутривенно вводили сыворотку мышей, иммунизированных белком IFN α -Pres1-Fc, и через 12 часов определяли изменения антигена Pres1 в сыворотке.

Фиг. 9 показывает, что IFN α -Pres1-Fc можно использовать в качестве профилактической вакцины против гепатита В. Мышей C57/BL6 подкожно иммунизировали свободными белками Pres1 гепатита В, Pres1-Fc и IFN α -Pres1-Fc и инфицировали 1×10^{11} мкг вируса AAV-HBV1.3 через хвостовую вену в день 28 после инокуляции. (а) Уровни анти-Pres1 в сыворотке перед инокуляцией вируса и через 1, 2, 3 и 4 недели после инокуляции вируса. (b) Уровни Pres1 в сыворотке определяли в указанные моменты времени. (c) Уровни HBsAg в сыворотке определяли на неделе 1, 2, 3 и 4 методом ELISA. (d) Доля HBsAg-положительных мышей после инокуляции AAV-HBV1.3 вируса.

Фиг. 10 показывает IFN α -Pres1-Fc в качестве терапевтической вакцины против хронического вирусного гепатита В. Мышей C57/BL6 инфицировали 1×10^{11} мкг AAV-HBV1.3 вируса инъекцией в хвостовую вену. Через 6 недель после инфицирования отбирали стабильно инфицированных мышей (n=8/группа) и подкожно инокулировали рекомбинантными Pres1, IFN α -Pres1-Fc белками раз в две недели, всего три раза. (а) Определение анти-Pres1 антигена в сыворотке; (b) Определение Pres1 антигена в сыворотке; (c) Определение связанного с HBV антигена HBsAg в сыворотке мыши

Фиг. 11 показывает, что эпитопы Т-хелперных клеток усиливали ответ антител при использовании IFN α -Pres1-Fc вакцины

По сравнению с IFN-preS1-Fc, IFN-Pan-preS1-Fc мог существенно усиливать иммуногенность антигенных молекул. C57/BL6 (n=8/группа) мышей подкожно иммунизировали белками Pres1 гепатита В, Pres1-Fc и IFN α -Pres1-Fc без алюминиевого адьюванта и определяли уровень Pres1-специфических антител в сыворотке методом ELISA в определенное время.

Фиг. 12 показывает IFN α -Pan-Pres1-Fc в качестве терапевтической вакцины против хронического вирусного гепатита В. Мышей C57/BL6 инфицировали инъекцией 1×10^{11} мкг AAV-HBV1.3 вируса в хвостовую вену. Через 6 недель после инфицирования отбирали стабильно инфицированных мышей (n=8/группа) и подкожно инокулировали рекомбинантными Pres1, IFN α -Pres1-Fc белками раз в две недели, всего три раза. (a) Определение Анти-Pres1 антигена в сыворотке; (b) Определение Pres1 антигена в сыворотке; (c) Определение уровня связанного с HBV антигена HBsAg в сыворотке мыши; (d) Определение уровня HBV-ДНК в сыворотке мыши методом количественной ПЦР.

Фиг. 13 показывает, что комбинация IFN α -Pres1-Fc и HBsAg коммерческой вакцины нарушала иммунную толерантность против HBsAg и индуцировала серологическую конверсию HBsAg-HBsAb. Мышей-носителей HBV иммунизировали подкожно IFN α -Pres1-Fc и HBsAg коммерческой вакциной один раз каждые две недели, всего три раза. (a) Уровень Pres1 в сыворотке мышей-носителей HBV, (b) уровень HBsAg, (c) уровень анти-Pres1 в сыворотке, (d) уровень анти-HBsAg в сыворотке, (e) уровень HBV-ДНК в сыворотке. *** , p<0,001

Фиг. 14 показывает, что IFN α -RBD(SARS-CoV2)-Fc может вызывать более сильный ответ антител, чем свободный SARS-Cov2 RBD белок. Balb/c (n=8/группа) мышей инокулировали свободными SARS-Cov-2 RBD, RBD-Fc, IFN α -RBD-Fc белками путем подкожной иммунизации и определяли уровень в сыворотке SARS-Cov2 S белок-специфических антител методом ELISA в определенное время, p<0,0001.

Фиг. 15 показывает, что мыши могли продуцировать высокотитровую антивирусную сыворотку после IFN α -RBD (SARS-CoV2)-Fc иммунизации, что могло полностью предотвратить SARS-CoV2 псевдовирусную инфекцию в клеточных экспериментах *in vitro*.

Фиг. 16 показывает определение антисывороточных RBD-специфических антител, продуцируемых в результате IFN α -Pan-RBD (исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD (южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc иммунизации. (a) Картина SDS-PAGE электрофореза IFN α -Pan-RBD(исходный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (b) Картина SDS-PAGE электрофореза IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (c) Связывание RBD-специфического антитела с RBD исходного штамма через 14 дней после инокуляции IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (d) Связывание RBD-специфического антитела с RBD южноафриканского мутантного штамма через 14 дней после инокуляции IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc.

Фиг. 17 (а) Картины SDS-PAGE электрофореза мышинных белков IFN α -RBD-Fc и IFN α -Pan-RBD-Fc. (b) Картины SDS-PAGE электрофореза белков IFN α -RBD-Fc, IFN α -Pan-RBD-Fc человека.

Фиг. 18 показывает, что Pan (Pan-DR-связывающий эпитоп) эпитоп CD4 Т-хелперных клеток может еще больше усилить иммуногенность IFN α -RBD-Fc. Мышей инокулировали белками 10 мкг мышинового IFN α -RBD-Fc, мышинового IFN α -Pan-RBD-Fc или 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc, человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc внутримышечным путем и бустер-иммунизацию осуществляли через 14 дней после инокуляции. Сыворотку мышей соответственно собирали на 7-й, 14-й и 28-й день после иммунизации и уровень RBD-специфического антитела в мышинной сыворотке определяли методом ELISA. *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$.

Фиг. 19 показывает, что алюминиевый адъювант может усиливать специфический гуморальный иммунный ответ, индуцируемый человеческим IFN α -RBD-Fc и человеческим IFN α -Pan-RBD-Fc белком. C57BL/6 мышей инокулировали 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc или человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc в день 0 и день 14 с (AL+) или без алюминиевого адъюванта (AL-); сыворотку мышей собирали на 7-й, 14-й и 28-й день после инокуляции и уровень SARS-CoV-2 RBD-специфических антител в мышинной сыворотке определяли методом ELISA. *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$.

Фиг. 20 показывает, что интраназальная инокуляция IFN-Pan-RBD-Fc может индуцировать высокие титры RBD-специфических IgG и IgA нейтрализующих антител. C57BL/6 мышей возраста 6-8 недель разделяли на 5 групп, по 10 мышей в каждой группе, и иммунизировали 10 мкг IFN α -pan-RBD-Fc или таким же молярным количеством RBD, RBD-Fc и IFN α -RBD-Fc белков путем интраназальной иммунизации, и интраназальная доза составляла 10 мкл на мышь. Мышей иммунизировали в день 0 и день 14 с использованием двух процедур иммунизации. Сыворотку мышей собирали на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й день после иммунизации и использовали метод ELISA для определения уровней SARS-CoV-2 RBD-специфических антител IgG(a) и IgA(b) в сыворотке каждой группы; в день 42 сыворотку собирали для эксперимента по нейтрализации SARS-CoV-2 псевдовируса *in vitro* (c). Статистический метод: однофакторный дисперсионный анализ, * $p < 0,05$ представляет значимую разницу, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фиг. 21 показывает, что интраназальная инокуляция SARS-CoV-2 вакцины IFN-Pan-RBD-Fc без адъюванта индуцировала высокие титры RBD-специфических IgG и IgA нейтрализующих антител в тканях носоглотки и легких. C57BL/6 мышей возраста 6-8 недель умерщвляли в день 28 после иммунизации и слизистую оболочку носа мышей извлекали и измельчали с использованием тканевого гомогенизатора. Гомогенизированную жидкость центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут и супернатант получали как супернатант слизистой оболочки носовой полости (NMDS). Метод ELISA использовали для определения уровней SARS-CoV-2 RBD-специфических антител IgG(a) и IgA(b) в супернатанте ткани слизистой оболочки носа (NMDS) каждой группы; на 28 день сыворотку собирали для эксперимента по нейтрализации SARS-CoV-2 псевдовируса *in vitro*

(с). Статистический метод: однофакторный дисперсионный анализ, $*p < 0,05$ представляет значимую разницу, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

Фиг. 22 показывает, что интраназальная инокуляция SARS-CoV-2 вакцины IFN-Pan-RBD-Fc без адьюванта индуцировала высокие титры RBD-специфических IgG и IgA антител в тканях легких. 6-8-недельных C57BL/6 мышей умерщвляли в день 28 после иммунизации (как показано в Фиг. 19). Для легких мышей с использованием шприца объемом 1 мл набирали около 0,8 мл HBSS+100 мкМ EDTA, вводили в эндотрахеальную трубку, осторожно продували и вводили путем ингаляции, повторяя это три раза, затем жидкость отсасывали, собирали в центрифужную пробирку; процедуру повторяли три раза и, наконец, получали около 2 мл жидкости лаважа легких. Жидкость лаважа легких мышей центрифугировали при 500 g в течение 5 минут, и полученный супернатант представлял собой жидкость бронхоальвеолярного лаважа мышей (BALF). Метод ELISA использовали для определения количества SARS-CoV-2 RBD-специфических антител IgG (a) и IgA (b) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) мышей в каждой группе. Статистический метод: однофакторный дисперсионный анализ, $*p < 0,05$ представляет значимую разницу, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

Фиг. 23 показывает экспрессию и очистку вакцинного белка Her2. Родственные белки экспрессировали и очищали в 293F клетках и размер и чистоту белков определяли методом SDS-PAGE и окрашивания кумасси бриллиантовым синим. а. IFN α -3-Fc (62,6кДа); б. IFN α -pan-3-Fc (63,9кДа); с. IFN α -pan-4-Fc (74,9кДа) и IFN α -4-Fc (73,6кДа).

Фиг. 24 показывает анализ противоопухолевой активности Her2 вакцин IFN α -3-Fc и IFN α -pan-3-Fc. Была создана мышьяная модель рака молочной железы TUBO, и мышей обрабатывали внутриопухолевой инъекцией родственных слитых белков раз в неделю всего 3 раза, когда размер опухоли достигал 50-80мм³. Дозировка IFN α -3-Fc составляла 10 мкг/доза/мышь, другие слитые белки вводили в эквимольных количествах и CpG использовали в качестве адьюванта. Размер опухоли измеряли и строили кривую роста опухоли.

Фиг. 25 показывает, что функция IFN α и Pan усиливала иммуногенность Her2 антигена. BALB/C мышей (n=5) возраста 6-8 недель подкожно инокулировали содержащими мышьяный Her2 слитый белок вакцинами 4-Fc, IFN α -4-Fc и IFN α -pan-4-Fc для иммунизации без добавления адьюванта. Дозировка для иммунизации составляла 10 мкг/доза/мышь для IFN α -4-Fc, а другие слитые белки инокулировали в эквимольных количествах. Венозную кровь собирали в день 14 и день 21 после иммунизации и уровень Her2-специфических IgG антител в сыворотке определяли методом ELISA.

Фиг. 26 показывает картину SDS-PAGE электрофореза IFN-NA1-Fc слитого белка.

Фиг. 27 показывает, что мышей внутримышечно инокулировали 10 мкг IFN α -NA1-Fc или таким же молярным количеством NA1 белка, а бустер-иммунизацию осуществляли через 14 дней после первой инокуляции. Сыворотку мышей собирали на 28-й день после иммунизации и определяли уровень NA1-специфических антител в мышьяной сыворотке методом ELISA. Мышей инфицировали путем назального введения 1000 БОЕ вируса

гриппа A/PR8 в день 42 после иммунизации. С третьего дня после инфицирования вирусом мышей наблюдали и регистрировали изменения массы тела. (а) Сыворотку мышей собирали через 28 дней после первой иммунизации и уровень HA1-специфических антител в мышинной сыворотке определяли методом ELISA. (b) Изменения массы тела мышей после инфицирования вирусом.

Фиг. 28:

Картины SDS-PAGE электрофореза белков IFN α -Pan-VZV-gE-Fc, IFN α -Pan-EBV-gp350-Fc и IFN α -Pan-HSV-2-gD-Fc.

Подробное описание изобретения

Чтобы были более понятны цель, техническое решение и преимущества настоящего изобретения, настоящее изобретение подробно описано ниже со ссылкой на примеры и сопровождающие чертежи. Примеры служат только для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, и Примеры являются лишь частью настоящего изобретения и не представляют все варианты осуществления настоящего изобретения. Объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Конструкция вакцинной платформы

Вакцинная платформа интерферон-целевой антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело) состоит из трех структурных единиц, где первой структурной единицей является интерферон, второй структурной единицей является Fc-область иммуноглобулина (или антитело), а третьей единицей является целевой антиген. В процессе конструирования эти три структурные единицы могут быть расположены и скомбинированы в произвольном порядке, а целевой антиген может быть соединен с эпитопом хелперной Th-клетки через линкер 2. Репрезентативные конструкции были следующими:

Фиг. 1 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гомодимера с расположением в следующем порядке: интерферон-связывающий фрагмент 1-целевой антиген-Fc иммуноглобулина.

Фиг. 2 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий фрагмент 1-IgG1-hole(впадина) и целевой антиген-IgG1-knob(выступ), соответственно.

Фиг. 3 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон-связывающий фрагмент 1-IgG1-knob и целевой антиген-IgG1-hole.

Затем авторы настоящего изобретения попытались соединить целевой антиген с эпитопом хелперной клетки посредством связывающего фрагмента 2, а затем объединить это с двумя другими компонентами вакцинной платформы. Репрезентативные конструкции были следующими:

Фиг. 4 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гомодимера с расположением в следующем порядке: интерферон - связывающий фрагмент 1 - T-хелперный эпитоп - связывающий фрагмент 2 - целевой антиген - Fc иммуноглобулина.

Фиг. 5 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон - связывающий фрагмент 1 - IgG1-hole и Т-хелперный эпитоп - связывающий фрагмент 2 - целевой антиген - IgG1-knob.

Фиг. 6 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гетеродимера в соответствии со следующей комбинацией: интерферон - связывающий фрагмент 1 - IgG1-knob и Т-хелперный эпитоп - связывающий фрагмент 2 - целевой антиген-IgG1-hole.

Пример 2. Конструирование, очистка и получение вакцинной платформы

Экспрессия и получение вакцинной платформы описаны на примере Pres1 вируса гепатита В и белка RBD коронавируса SARS-CoV-2 в форме гомодимера.

1. Конструкция вектора, трансфекция клетки-хозяина и индуцированная экспрессия

1.1. Структурные единицы вакцины конструировали на векторе PEE12.4 путем молекулярного клонирования для получения плазмиды, экспрессирующей слитый белок, которую затем транзитивно трансфицировали в клетки 293F, собирали культуральный супернатант и, наконец, представляющий интерес белок очищали аффинной хроматографией с белком А.

Конструкция вектора (на примере антигена preS1 HBV)

(1) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-BsiwI-Pres1-BstbI-hIgG1-EcoRI

(2) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-BsiwI-RBD(SARS-CoV-2)-BstbI-hIgG1-EcoRI

(3) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-Bsiwi-PADER-Pres1-hIgG1-EcoRI

(4) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-Bsiwi-PADER-RBD(SARS-CoV-2)-hIgG1-EcoRI

Линкеры между каждым из фрагментов слитого белка были следующими:

(1) Линкер между интерфероном и Pres1 представлял собой связывающий фрагмент 1

(2) Линкер между интерфероном и RBD (SARS-CoV-2) представлял собой связывающий фрагмент 1

(3) Линкер между интерфероном и PADER представлял собой связывающий фрагмент 1, а линкер между PADER и Pres1 представлял собой связывающий фрагмент 2

(4) Линкер между интерфероном и PADER представлял собой связывающий фрагмент 1, а линкер между PADER и RBD (SARS-CoV-2) представлял собой связывающий фрагмент 2

1.2. Быстрая экспрессия представляющего интерес белка путем транзитивной трансфекции:

(1) Размораживание клеток: Freestyle 293F клетки замораживали в среде CD OptiCHO™ (содержащей 10% DMSO) при концентрации 3×10^7 клеток/мл. Клетки

извлекали из жидкого азота, а затем быстро растворяли в 37°C водяной бане, добавляли в 15-мл центрифужную пробирку, содержащую 10 мл OptiCHO™ среды, и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант сливали и клеточный осадок суспендировали и культивировали в 30 мл среды OptiCHO™ при 37°C, 8% CO₂, 135 об/мин. Через 4 дня клетки подвергали продленному культивированию, и концентрация не должна была превышать 3×10⁶ клеток/мл в процессе продленного культивирования.

(2) За два дня до трансфекции суспензию культивированных 293F клеток подготавливали для транзиторной трансфекции (200 мл) с плотностью посева 0,6-0,8×10⁶ клеток/мл.

(3) Через два дня клетки в суспензии для трансфекции подсчитывали, и плотность клеток составила 2,5-3,5×10⁶ клеток/мл, затем клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и супернатант сливали.

(4) Клетки ресуспендировали с 50 мл свежей среды Freestyle 293 и снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и супернатант сливали.

(5) 293F клетки ресуспендировали с 200 мл среды Freestyle 293.

(6) 600 мкг плазмид разбавляли с использованием 5 мл среды Freestyle 293 и фильтровали через 0,22 мкм фильтр для стерилизации.

(7) 1,8 мг PEI разбавляли с использованием 5 мл среды Freestyle 293 и фильтровали через 0,22 мкм фильтр для стерилизации. Сразу после этого 5 мл плазмиды и 5 мл PEI смешивали и давали выстояться при комнатной температуре в течение 5 минут.

(8) Смесь плазмиды/PEI добавляли к клеточной суспензии, культивировали в 37°C, 8% CO₂, 85 об/мин инкубаторе и тем временем дополняли фактором роста 50 мкг/л LONG™ R3IGF-1.

(9) Через 4 часа добавляли 200 мл EX-CELL™ 293 среды и 2 mM глутамина, а затем клетки продолжали культивировать при 135 об/мин.

(10) Через 24 часа добавляли 3,8 mM ингибитора пролиферации клеток VPA; через 72 часа добавляли 40 мл среды D, а затем клетки продолжали культивировать; через 6-8 дней после трансфекции (выживаемость клеток была менее 70%) супернатант собирали для следующей стадии очистки.

1.3. Сбор, очистка и подтверждение слитого белка методом электрофореза

2. Очистка представляющего интерес белка с использованием Белка А:

(1) Получение образца: клеточную культуральную суспензию переносили в 500-мл центрифужную чашу и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин; осадок сливали; и супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр для удаления примеси, а затем добавляли NaN₃ в конечной концентрации 0,05% для предотвращения бактериального загрязнения в процессе очистки.

(2) Сборка хроматографической колонки: соответствующее количество агарозы с белком А (количество было рассчитано путем очистки 20 мг слитого белка Fc человека на 1 мл белка А) тщательно смешивали, добавляли в хроматографическую колонку, оставляли при комнатной температуре около 10 минут; после разделения белка А и 20% раствора

этанолу выпускное отверстие на дне открывали, чтобы позволить этанольному раствору медленно вытекать под действием силы тяжести.

(3) Хроматографическую колонку промывали и уравнивали 10 колоночными объемами дистиллированной воды и связывающего буфера (20 мМ фосфата натрия+0,15 М NaCl, pH 7,0), соответственно.

(4) Образец загружали насосом с постоянной подачей при скорости потока 10 колоночных объемов/час и фильтрат колонки собирали; и образец повторно загружали два раза.

(5) Колонку промывали более чем 10 колоночными объемами связывающего буфера для удаления примесных белков до тех пор, пока в вытекающем потоке больше не обнаруживалось никакого белка.

(6) Колонку элюировали элюирующим буфером (0,1 М глицина, pH 2,7); элюент собирали в отдельные пробирки, 1 пробирка на 1 мл элюента; и пики элюции наблюдали с раствором индикатора белка (анализ белка Bio-Rad). Пробирки для сбора элюированных пиков перемешивали и добавляли соответствующее количество 1 М Tris, pH 9,0 (для доведения pH до 6-8, что должно отличаться более чем на 0,5 от изоэлектрической точки очищенного белка).

(7) Представляющий интерес белок помещали в необходимый буфер с использованием спин-колонки для обессоливания Zeba или концентрирующей спин-колонки (обратите внимание, что pH буфера следует отрегулировать, чтобы избежать изоэлектрической точки белка). BSA использовали в качестве стандарта, а концентрацию белка определяли методом SDS-PAGE электрофореза и NanoDrop2000.

(8) После элюирования колонку промывали 20 колоночными объемами дистиллированной воды, а затем 10 колоночными объемами 20% этанола. В завершение, гелевую среду следует погрузить в раствор этанола и хранить при 4°C.

3. Картина SDS-PAGE электрофореза белка показана на Фиг. 7.

Пример 3. IFN α -Pres1-Fc, Pres1-Fc могут индуцировать более сильный иммунный ответ у мышей, чем Pres1 антиген отдельно.

Материалы: Самцов мышей C57BL/6 (возраст 5-8 недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.; меченный пероксидазой хрена (HRP) козий антимышиный IgG закупили у Beijing Kangwei Biology Technology Co., Ltd.; 96-луночный планшет для анализа ELISA закупили у Corning Costa; хромогенный раствор для ELISA закупили у eBioscience; микропланшет-ридер SPECTRA max PLUS 384 закупили у Molecular Company of the United States. Алюминиевый адъювант закупили у SIGMA.

Методы:

(1) Мышей иммунизировали слитым белком Pres1; в частности, 80 пмоль IFN-Pres1-Fc, или 80 пмоль Pres1-Fc, или Pres1 белка смешивали с алюминиевым адъювантом и подкожно вводили мышам. В определенные моменты времени сыворотку мышей собирали путем отбора крови из глазницы для детекции антител.

(2) Антитело, продуцируемое IFN α -Pres1-Fc, обладало экстенсивным

нейтрализующим эффектом на различные генотипы HBV вируса. 5-недельных самцов C57BL/6 мышей инфицировали 1×10^{11} вг AAV-HBV 1.3 (с HBV генотипами B, C и D) через хвостовую вену. Через 6 недель мышей с продолжительной и стабильной экспрессией HBV антигена отбирали для испытания. Отобраным мышам (4 мыши/группа) вводили внутривенно сыворотку от IFN α -Pres1-Fc иммунизированных мышей при 200 мкл/мышь. Через 12 часов сыворотку мышей собирали и изменения Pres1 антигена у мышей до и после инъекции антисыворотки определяли методом ELISA.

(3) Анти-Pres1 специфическое антитело в сыворотке определяли методом ELISA. Pres1 (2 мкг/мл) покрывающий раствор добавляли в ELISA планшет (Corning 9018) при 50 мкл на лунку и планшет покрывали при 4°C в течение ночи. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет блокировали 5% блокирующим раствором (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), добавляли в блокированный ELISA планшет при 50 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимышиный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS) при 50 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB 100 мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте до проявления цвета; в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄) для прекращения проявления цвета и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450 -630.

Результаты: Иммуногенность свободного Pres1 была слабой, и иммуногенность значительно повышалась, когда Pres1 был слит с IFN α и Fc-фрагментом с образованием IFN α -Pres1-Fc слитого белка, как показано на Фиг. 8(a). Антитело, индуцированное IFN α -Pres1-Fc, могло иметь широкий спектр нейтрализующих эффектов на различные HBV генотипы, как показано на Фиг. 8(b).

Пример 4. IFN α -Pres1-Fc можно использовать в качестве профилактической вакцины против гепатита В

Материалы: самцов мышей C57BL/6 (возраст 6-8 недель) закупают у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., а набор для детекции HBsAg закупают у Shanghai Kehua Bio-Engineering Co., Ltd. AAV-HBV 1.3 вирус закупают у Guangzhou PackGene Biotech Co., Ltd. Другие экспериментальные материалы были такими же, как используемые в Примере 3.

Методы:

(1) Мышей иммунизировали подкожно при помощи 80 пмоль различных форм Pres1 вакцин, включая Pres1, Pres1-Fc и IFN α -Pres1-Fc белки. В день 28 после иммунизации сыворотку мышей собирали и мышей инфицировали 1×10^{11} вг AAV-HBV 1.3 вируса, после этого сыворотку мышей собирали каждую неделю в течение четырех недель для определения анти-Pres1 антител, HBsAg и Pres1 антигена в сыворотке. На третьей неделе определяли уровни HBV-ДНК в периферической крови мышей.

(2) Детекция Pres1-специфического антигена в сыворотке методом ELISA. Покрытие антигеном: покрывающий раствор XY007 антитела к Pres1 (4 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Corning 9018) при 50 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет блокировали 5% блокирующим раствором (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100), добавляли в заблокированный ELISA планшет при 50 мкл на лунку (при этом две дублирующие лунки были установлены для каждого разведения) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли 50 мкл конъюгата с ферментом (полученного из набора для детекции HBsAg Kehua) на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB 100 мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте до проявления цвета; в каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄) для прекращения проявления цвета и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450 -630.

Результаты: Мыши в группе, иммунизированной IFN α -Pres1-Fc, могли продуцировать высокий уровень антител к Pres1 до инокуляции вирусом, и антитела оставались на высоком уровне во время вирусной инфекции, как показано на Фиг. 9 (а). По сравнению с группой без иммунизации белком, иммунизация IFN-Pres1-Fc вакциной могла существенно предотвращать HBV инфекцию, и анти-preS1 антитело, продуцируемое после иммунизации, могло быстро и полностью устранять preS1 антиген в сыворотке (Фиг. 9(b)), и большинство вирус-инфицированных мышей в группе, иммунизированной IFN-Pres1-Fc, были отрицательными на HBsAg в периферической крови (Фиг. 9(c, d)). Описанные выше экспериментальные результаты показывают, что IFN-Pres1-Fc в качестве вакцины мог эффективно предотвращать HBV инфекцию, как показано на Фиг. 9.

Пример 5. IFN α -Pres1-Fc в качестве терапевтической вакцины против хронического вирусного гепатита В

Материалы: C57BL/6 самцов мышей (4 возраст недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. AAV-HBV 1.3 закупили у Guangzhou PackGene Biotech Co., Ltd. Набор для детекции HBsAg закупили у Shanghai Kehua Bio-Engineering Co., Ltd., и другие экспериментальные материалы были такими же, как в Примере 4.

Методы:

(1) Скрининг мышей-носителей HBV: 4-недельным HBV C57BL/6 мышам вводили 1×10^{11} вг AAV-HBV 1.3 вируса через хвостовую вену и HBsAg антиген HBV определяли через 1-6 недель для отбора мышей со стабильной экспрессией HbsAg, которых использовали в качестве мышей-носителей HBV для экспериментов.

(2) Отобраным мышам подкожно вводили 80 пмоль различных форм белка Pres1 раз в две недели, всего три иммунизации. Сыворотку мышей собирали через 14 дней после иммунизации, а затем собирали раз в неделю и уровни анти-Pres1 антитела, HBsAG и Pres1 антигена в мышинной сыворотке определяли методом ELISA. Содержание HBV-ДНК в периферической крови мышей определяли после последнего сбора крови.

Результаты: Был определен preS1 антиген в сыворотке мышей-носителей, иммунизированных IFN-Pres1-Fc вакциной, а также изменения антител к Pres1 и HBsAg в сыворотке. Результаты показывают, что после иммунизации IFN α -Pres1-Fc вакциной у мышей вырабатывались высокие уровни анти-Pres1 антител, как показано на Фиг. 10(a), и preS1 антиген в сыворотке мог быть полностью устранен, как показано на Фиг. 10(b). В то же время, HBsAg в сыворотке также снижался в определенной степени, как показано на Фиг. 10(c), при этом необработанная контрольная группа и группа, иммунизированная только Pres1 вакциной, не имели никакого терапевтического эффекта, как показано на Фиг. 10.

Пример 6. Эпитопы хелперных Т-клеток усиливали ответ антител, вызываемый IFN α -Pres1-Fc вакциной

Материалы: такие же, как в Примере 3

Методы:

(1) мышей иммунизировали Pres1 слитыми белками, в частности, 80 пмоль IFN-Pan-Pres1-Fc, содержащего Pan эпитоп, или 80 пмоль IFN-Pan-Pres1-Fc, Pres1-Fc, Pres1 белка подкожно вводили мышам. В определенные моменты времени сыворотку мышей собирали путем отбора крови из глазницы для детекции антител.

(2) Детекцию анти-Pres1 специфических антител в сыворотке методом ELISA осуществляли так же, как в Примере 3.

Результаты: По сравнению с вакцинами на основе слитых белков, такими как IFN-preS1-Fc, IFN-Pan-preS1-Fc мог существенно усиливать иммуногенность антигенных молекул и индуцировать продукцию широкого спектра нейтрализующих антител. C57/BL6 (n=8/группа) мышей подкожно иммунизировали белками Pres1 гепатита В, Pres1-Fc и IFN α -Pres1-Fc без алюминиевого адьюванта и уровень Pres1-специфических антител в сыворотке определяли методом ELISA в определенное время.

Пример 7. IFN α -Pan-Pres1-Fc в качестве терапевтической вакцины против хронического вирусного гепатита В

Материалы: C57BL/6 самцов мышей (возраст 4 недели) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. AAV-HBV 1.3 закупили у Guangzhou PackGene Biotech Co., Ltd. Набор для детекции HBsAg закупили у Shanghai Kehua Bio-Engineering Co., Ltd., а другие экспериментальные материалы были такими же, как в Примере 4.

Методы:

(1) Скрининг мышей-носителей HBV: 4-недельным HBV C57BL/6 мышам вводили 1×10^{11} вг AAV-HBV 1.3 вируса через хвостовую вену и HBsAg антиген HBV определяли через 1-6 недель для отбора мышей со стабильной экспрессией HbsAg, которых использовали в качестве мышей-носителей HBV для экспериментов.

(2) Отобранным мышам подкожно вводили 80 пмоль различных форм белка Pres1 раз в две недели, всего три иммунизации. Сыворотку мышей собирали через 14 дней после иммунизации, а затем собирали раз в неделю и определяли уровни анти-Pres1 антител, HBsAG и Pres1 антигена в мышинной сыворотке методом ELISA. Содержание HBV-ДНК в периферической крови мышей определяли после последнего сбора крови.

Результаты: Был определен preS1 антиген в сыворотке мышей-носителей, иммунизированных IFN α -Pan-Pres1-Fc вакциной, а также изменения уровней в сыворотке антител к Pres1 и HBsAg. Результаты показывают, что после иммунизации IFN-Pan-Pres1-Fc вакциной мыши продуцировали высокий уровень анти-Pres1 антител, как показано на Фиг. 12(a). Кроме того, preS1 антиген в сыворотке мог быть полностью устранен, как показано на Фиг. 12(b), и уровень HBsAg в сыворотке также снижался в определенной степени, как показано на Фиг. 12(c), при этом необработанная контрольная группа и группа, иммунизированная только Pres1 вакциной, не имели никакого терапевтического эффекта. Кроме того, уровень ДНК HBV также существенно снижался в группе, иммунизированной IFN α -Pan-Pres1-Fc, как показано на Фиг. 12(d).

Пример 8. Комбинация IFN α -Pan-Pres1-Fc и HBsAg коммерческой вакцины нарушала иммунную толерантность против HBsAg и индуцировала HBsAg-HBsAb серологическую конверсию.

Материалы: C57BL/6 самцов мышей (возраст 4 недели) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. AAV-HBV 1.3 закупили у Guangzhou PackGene Biotech Co., Ltd. Набор для детекции HBsAg закупили у Shanghai Kehua Bio-Engineering Co., Ltd., и набор анти-HBsAg закупили у Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd., коммерческую HBsAg вакцину закупили у Amy Hansen Vaccine (Dalian) Co., Ltd. Другие экспериментальные материалы были такими же, как используемые в Примере 7.

Методы:

(1) Скрининг мышей-носителей HBV: 4-недельным HBV C57BL/6 мышам вводили 1×10^{11} вг AAV-HBV 1.3 вируса через хвостовую вену и HBsAg антиген HBV определяли через 1-6 недель для отбора мышей со стабильной экспрессией HbsAg, которых использовали в качестве мышей-носителей HBV для экспериментов.

(2) Отобранных мышей-носителей HBV иммунизировали при помощи 80 пмоль IFN α -pan-Pres1-Fc и 2 мкг коммерческой HBsAg вакцины одновременно два раза подряд с интервалом 14 дней. Сыворотку мышей собирали через 14 дней после первой иммунизации и сыворотку мышей собирали каждую неделю после этого и определяли изменения анти-Pres1, Pres1, анти-HBsAg и HBsAg в сыворотке. Когда сыворотку мышей собирали последний раз, определяли уровень HBV-ДНК в сыворотке.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Было обнаружено, что комбинация IFN α -Pan-Pres1-Fc с коммерческим HBsAg в качестве стратегии лечения хронического гепатита В может в конечном итоге нарушить толерантность к HBsAg. Иммунный ответ, генерируемый у HBV-толерантных мышей, мог полностью уничтожить антиген preS1 в сыворотке, как показано на Фиг. 13(a), и в сыворотке наблюдалась высокая концентрация антител к Pres1 (Фиг. 13(c)). Интересно, что вакцина IFN-Pan-Pres1-Fc одновременно эффективно уничтожала HBsAg в сыворотке и индуцировала частичную серологическую конверсию HBsAb (Фиг. 13(b) и 4(d)), что клинически рассматривалось как ключевой показатель излечения от HBV. Кроме того, были определены уровни экспрессии HBV-связанной ДНК, в периферической крови методом количественной флуоресцентной ПЦР в реальном времени. Результаты показали,

что по сравнению с контрольной группой иммунизация комбинацией IFN α -Pan-Pres1-Fc и коммерческого HBsAg может в результате снизить уровень ДНК HBV в периферической крови (Фиг. 13(е)). Основываясь на приведенных выше результатах, авторы изобретения предложили вакцинную стратегию для лечения хронического гепатита В с использованием комбинации IFN α -Pan-Pres1-Fc и коммерческой вакцины на основе HBsAg.

Пример 9. IFN α -RBD(SARS-CoV2)-Fc может вызывать более сильный ответ антител, чем свободный белок RBD SARS-Cov2

Материалы: Balb/c самцов и самок мышей (возраст 6-8 недель) закупают у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., а SARS-CoV-2 RBD белок закупают у Beijing KEY-BIO Biotech Co.,Ltd. 293-hACE2 клетки получали от профессора Zhang Zheng (Shenzhen Third People's Hospital). Набор для люциферазного репортерного анализа закупают у Promega.

Другие экспериментальные материалы были такими же, как используемые в Примере 3.

Методы:

(1) Мышей иммунизировали IFN α -RBD(SARS-Cov-2)-Fc слитым белком; в частности, мышей подкожно иммунизировали 10мкг IFN α -RBD-Fc, RBD-Fc или 10мкг RBD белка, смешанного с алюминиевым адьювантом. Через 28 дней после иммунизации сыворотку мышей собирали путем отбора крови из глазницы для детекции SARS-Cov-2-специфических антител.

(2) Определение антител к RBD SARS-cov2 в сыворотке. Покрытие антигеном: покрывающий раствор RBD (1,5 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Corning 9018) при 100 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260мкл на лунку. Планшет блокировали с использованием 100мкл 5% блокирующего раствора (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000...), добавляли в блокированный ELISA планшет при 100мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимышиный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS) при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB при 100 мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут, ожидая проявления цвета субстратом. В каждую лунку добавляли 50мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄), чтобы остановить проявление цвета, и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450-630.

Расчет титра: выбирали максимальный коэффициент разведения, который был положительным, и коэффициент разведения умножали (X) на значение OD/пороговое значение (0,1), соответствующее коэффициенту разведения, и полученное значение представляло собой титр антитела, соответствующий сыворотке.

(3) Эксперимент по нейтрализации псевдовирусного S белка SARS-CoV-2 S in vitro. Антисыворотку разбавляли 1:3 и добавляли в 96-луночный планшет и 50 мкл

псевдовирусных частиц с люциферазой-спайковым белком добавляли в лунки, смесь вируса и антитела оставляли при 37°C в течение 1 часа и 10^4 293-hACE2 клеток на лунку добавляли в 96-луночный планшет. 96-луночный планшет оставляли в 37°C инкубаторе клеточной культуры и активность люциферазы определяли через 48 часов.

Результаты: Иммуногенность свободного SARS-CoV-2 RBD была слабой, и его иммуногенность значительно улучшалась, когда IFN α и Fc были добавлены к области белка RBD SARS-CoV-2 с образованием слитого белка IFN α -RBD-Fc, как показано на Фиг. 14. Антитела, индуцированные IFN α -RBD-Fc, могли блокировать инфицирование клеток псевдовирусом SARS-CoV-2 S белка *in vitro*, как показано на Фиг. 15.

Пример 10. Детекция антисывороточных RBD-специфических антител, продуцируемых в результате иммунизации с использованием FN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc.

Материалы: Balb/c самцов и самок мышей (возраст 6-8 недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., а RBD белок исходного SARS-CoV-2 штамма закупили у Beijing KEY-BIO Biotech Co.,Ltd. RBD белок южноафриканского мутантного штамма SARS-CoV-2 закупили у Beijing Sino Biological Technology Co., Ltd.

Другие экспериментальные материалы были такими же, как используемые в Примере 3.

Методы:

(1) Конструкция и экспрессия IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc белка были такими же, как в Примере 2.

(2) мышей иммунизировали слитым белком IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутант SARS-CoV-2)-Fc; в частности, 10мкг белка IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc или IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc смешивали с алюминиевым адъювантом и подкожно инокулировали мышам. Через 14 дней после иммунизации сыворотку мышей собирали путем отбора крови из глазницы для детекции SARS-Cov-2-специфических антител.

(3) Анализ ответа антител методом ELISA был таким же, как описано в Примере 9.

Результаты: Результаты SDS-PAGE показали нужный размер полосы IFN α -Pan-RBD(SARS-CoV-2 исходный штамм)-Fc, указывая на то, что мутантный SARS-CoV-2 IFN α -RBD (исходный штамм SARS-CoV-2)-Fc вакцинный белок был успешно сконструирован, экспрессирован и очищен (Фиг. 16a). SDS-PAGE результаты показали нужный размер полосы IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, указывая на успешную конструкцию, экспрессию и очистку мутантного вакцинного белка SARS-CoV-2 IFN α -RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc (Фиг. 16b). Результаты ELISA показали, что антитела, индуцированные иммунизацией мышей IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, могли связываться с RBD белком исходного штамма SARS-CoV-2, и не

было никакой значимой разницы в способности к связыванию с RBD исходного штамма (Фиг. 16с). При этом, результаты ELISA для RBD южноафриканского мутантного штамма также показали, что антитела, индуцированные иммунизацией мышей с использованием IFN α -Panan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, могли связываться с RBD южноафриканского мутантного штамма, и их связывающие способности были эквивалентными (Фиг. 16d).

Пример 11

Материалы: C57BL/6 самок мышей (возраст 6-8 недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. SARS-CoV-2 RBD белок, используемый в ELISA, закупили у Beijing KEY-BIO Biotech Co., Ltd.; мышиный IFN α -RBD-Fc, мышиный IFN α -Pan-RBD-Fc, человеческий IFN α -RBD-Fc и человеческий IFN α -Pan-RBD-Fc белки получали на месте, и другие экспериментальные материалы были такими же, как в Примере 3.

Методы:

(1) Способы конструирования белка, конструирования плазмиды и очистки белка были такими же, как в Примерах 1 и 2.

(2) Иммунизация мышей вакцинными белками. Вакцинные белки 10 мкг мышинового IFN α -RBD-Fc, мышинового IFN α -Pan-RBD-Fc или 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc, человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc смешивали с 20 мкг алюминиевого адьюванта в течение ночи, а затем инокулировали мышам путем внутримышечной иммунизации, а бустер-иммунизацию осуществляли через 14 дней после первоначальной инокуляции. Сыворотку мышей собирали на 7-й, 14-й и 28-й день после иммунизации и определяли уровень RBD-специфических антител в мышинной сыворотке методом ELISA.

(3) Определение антител к RBD SARS-cov2 в сыворотке. Покрытие антигеном: покрывающий раствор RBD (1,5 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Corning 9018) при 100 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет блокировали при помощи 100 мкл 5% блокирующего раствора (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000...), добавляли в блокированный ELISA планшет при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимышиный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS) при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB при 100 мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут, ожидая проявления цвета субстратом. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄), чтобы остановить проявление цвета, и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450-630. Расчет титра: выбирали максимальный коэффициент разведения, который был положительным, и коэффициент разведения умножали (X) на значение OD/пороговое значение (0,1), соответствующее коэффициенту разведения, и полученное значение представляло собой

титр антитела, соответствующий сыворотке.

Результат:

Как показано на Фиг. 17, после того, как белок был экспрессирован и очищен, результаты SDS-PAGE показали, что размер белка соответствовал ожидаемому и в целевом положении проявлялась одна полоса.

Как показано на Фиг. 18, добавление Pan (Pan-DR-связывающий эпитоп) эпитопа CD4 Т-хелперных клеток может усиливать иммунитет мышинового IFN α -RBD-Fc и человеческого IFN α -RBD-Fc. Экспериментальные результаты показали, что добавление pan эпитопа может привести к более высокой продукции RBD-специфического антигена в день 7, день 14 или день 28 после иммунизации вакцинным белком для мышинового IFN α -Pan-RBD-Fc по сравнению с мышинным IFN α -RBD-Fc и для человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc по сравнению с человеческим IFN α -RBD-Fc.

Пример 12

Материалы: C57BL/6 самок мышей (6-8 возраст недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. и SARS-CoV-2 RBD белок, используемый в ELISA, закупили у Beijing KEY-BIO Biotech Co.,Ltd. Человеческий IFN α -RBD-Fc и человеческий IFN α -Pan-RBD-Fc белки, используемые для иммунизации, все были получены на месте. Другие экспериментальные материалы были такими же, как используемые в Примере 3.

Методы:

(1) Для иммунизации мышей использовали белки человеческого IFN α -RBD-Fc и человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc. 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc или человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc белка смешивали с алюминиевым адъювантом в течение ночи, в качестве образца вакцины, содержащей алюминиевый адъювант; для другой группы 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc или человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc белка разбавляли PBS, в качестве образца вакцины без адъюванта. В присутствии или в отсутствие алюминиевого адъюванта мышей инокулировали белками 10 мкг человеческого IFN α -RBD-Fc или человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc, вводимыми внутримышечно, а затем через 14 дней после инокуляции осуществляли бустер-иммунизацию. Сыворотку мышей собирали на 7-й, 14-й и 28-й день после иммунизации и определяли уровень RBD-специфических антител в мышинной сыворотке методом ELISA.

(2) Определение антитела к RBD SARS-cov2 в сыворотке. Покрытие антигеном: покрывающий раствор RBD (1,5 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Corning 9018) при 100 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет блокировали с использованием 100мкл 5% блокирующего раствора (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000...), добавляли в заблокированный ELISA планшет при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимышиный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS)

при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат ТМВ при 100мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут, ожидая проявления цвета субстратом. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄), чтобы остановить проявление цвета и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450-630. Расчет титра: выбирали максимальный коэффициент разведения, который был положительным, и коэффициент разведения умножали (X) на значение OD/пороговое значение (0,1), соответствующее коэффициенту разведения, и полученное значение представляло собой титр антитела, соответствующий сыворотке.

Результат:

Как показано на Фиг. 19, применение алюминиевого адьюванта может усиливать иммуногенность человеческого IFN α -RBD-Fc и человеческого IFN α -Pan-RBD-Fc белков. Хотя вакцины, содержащие человеческий IFN α -RBD-Fc и человеческий IFN α -Pan-RBD-Fc без адьюванта, могли вызывать ответы антител с высокими титрами, белки IFN α -RBD-Fc человека и IFN α -Pan-RBD-Fc человека с алюминиевым адьювантом могли еще больше повышать уровень ответа RBD-специфических антител на 7-й день, 14-й день и 28-й день после инокуляции по сравнению с группой без адьюванта.

Пример 13

Материалы:

Экспериментальных животных C57BL/6 мышей возраста 6-8 недель закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., с сертификатом на животных № 110011200106828974; RBD белок для иммунизации закупили у Beijing KEY-BIO Biotech Co.,Ltd.; RBD-Fc, IFN α -RBD-Fc и IFN-pan-RBD-Fc белки получали на месте; все адьюванты закупили у SERVA, Germany; меченный пероксидазой хрена (HRP) козий антимишиный IgG закупили у Beijing Kangwei Biology Technology Co., Ltd.; 96-луночный планшет для ELISA закупили у Corning Costar; ELISA хромогенный раствор закупили у eBioscience; микропланшет-ридер SPECTRA max PLUS 384 закупили у Molecular Company of the United States; тканевый гомогенизатор закупили у Beijing Heros Technology Co., Ltd.

Методы:

Мышей возраста 6-8 недель разделяли на 5 групп, по 10 мышей в каждой группе, и иммунизировали 10 мкг IFN α -pan-RBD-Fc или таким же молярным количеством RBD, RBD-Fc и IFN α -RBD-Fc белков путем интраназальной иммунизации, и интраназальная доза составляла 10 мкл на мыш. Мышей иммунизировали в день 0 и день 14 с использованием двух процедур иммунизации. Сыворотку мышей собирали на 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й день после иммунизации и использовали метод ELISA для определения содержания SARS-CoV-2 RBD-специфических антител в сыворотке для каждой группы; сыворотку в день 28 собирали для эксперимента по нейтрализации SARS-CoV-2 псевдовируса *in vitro*.

Результат:

Как показано на Фиг. 20, две назальные иммунизации белками RBD и RBD-Fc могли в некоторой степени вызывать ответ антител. Уровни сывороточных IgG и IgA в этой же

временной точке, индуцированные двумя назальными иммунизациями IFN α -pan-RBD-Fc, были существенно выше по сравнению с уровнями в группах введения RBD, RBD-Fc и IFN-RBD-Fc. Результаты экспериментов по нейтрализации псевдовirusа показали, что по сравнению с группами, иммунизированными RBD и RBD-Fc, IFN-RBD-Fc может индуцировать более высокий уровень нейтрализующих антител.

Пример 14

Материалы:

Материалы были такими же, как в Примере 10.

Методы:

Мышей возраста 6-8 недель разделяли на 4 группы, по 5 мышей в каждой группе, и иммунизировали 10 мкг IFN α -pan-RBD-Fc или таким же молярным количеством RBD, RBD-Fc и IFN α -RBD-Fc белков путем интраназальной иммунизации, и доза составляла 10 мкл на мышью. Мышей иммунизировали в день 0 и день 14 с использованием двух процедур иммунизации. На 28-й день после иммунизации собирали супернатант ткани слизистой оболочки носа и жидкость лаважа легких мышей и определяли уровни в сыворотке SARS-CoV-2 RBD-специфических антител в каждой группе методом ELISA, а испытание по нейтрализации псевдовirusа SARS-CoV-2 использовали для определения нейтрализации псевдовirusа SARS-CoV-2 в сыворотке и супернатанте ткани слизистой оболочки носа.

Получение супернатанта ткани слизистой оболочки носа и жидкости лаважа легких мышей, используемых в экспериментах по иммунизации: После того, как мышью умерщвляли в состоянии покоя, слизистую оболочку носа мышью собирали и измельчали с использованием тканевого гомогенизатора. Гомогенизированную жидкость центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут и супернатант использовали как супернатант ткани слизистой оболочки носовой полости (NMDS). Для легких мышей с использованием шприца объемом 1 мл набирали около 0,8 мл HBSS+100 мкМ EDTA, вводили в эндотрахеальную трубку, осторожно продували и вводили путем ингаляции, повторяя это три раза, затем жидкость отсасывали, собирали в центрифужную пробирку; процедуру повторяли три раза и, наконец, получали около 2 мл жидкости лаважа легких. Жидкость лаважа легких мышей центрифугировали при 500 g в течение 5 минут, и полученный супернатант представлял собой жидкость бронхоальвеолярного лаважа мышью (BALF), а осадок представлял собой лимфоциты в легких мышью, которые можно было далее анализировать.

Результат:

Как показано на Фиг. 21, по сравнению с RBD и RBD-Fc белком IFN α -pan-RBD-Fc белок мог индуцировать сильный локальный ответ IgG антител и IgA мукозального иммунитета в слизистой оболочке носа после двух назальных иммунизаций. Интенсивность вызываемого IFN α -pan-RBD-Fc белком ответа была более сильной, чем в группе RBD и RBD-Fc. Результаты эксперимента по нейтрализации псевдовirusа показали, что группа иммунизации белком IFN α -pan-RBD-Fc могла индуцировать более высокий титр нейтрализующих антител в слизистой оболочке носа.

Как показано на Фиг. 22, две назальные иммунизации C57BL/6 мышей слитым белком IFN α -pan-RBD-Fc также вызывали сильную секрецию IgG антитела и IgA антитела в местной легочной ткани. Результаты экспериментов по нейтрализации псевдовируса показали, что IFN α -pan-RBD-Fc индуцировал более высокий титр нейтрализующих антител, чем RBD и RBD-Fc.

Пример 15

Her2 принадлежит к HER семейству трансмембранных рецепторов фактора роста I типа и состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного тирозинкиназного домена. Как только лиганд связывается с внеклеточным доменом, белок HER димеризуется и трансфосфорилирует свой внутриклеточный домен. Фосфорилированные тирозиновые остатки могут связываться с различными внутриклеточными сигнальными молекулами, активировать нисходящие сигнальные пути и регулировать транскрипцию генов. Большинство регулируемых генов связаны с клеточной пролиферацией, выживанием, дифференцировкой, ангиогенезом, инвазией и метастазированием. Внеклеточный сегмент белка Her2 относительно большой, содержит более 600 аминокислот и может быть разделен на четыре домена, а именно домены I, II, III и IV. Одобренный в настоящее время трастузумаб преимущественно связывается с доменом IV, пертузумаб преимущественно связывается с доменом II, а полипептидная вакцина E75, которая проходит клинические испытания, нацелена на домен III. Это показывает, что в разных доменах есть несколько важных сайтов, которые могут опосредовать противоопухолевый эффект. Для исследования вакцинной платформы для профилактики и лечения опухолей авторы изобретения выбрали опухолевой антиген Her2 в качестве мишени, сконструировали содержащие слитые белки IFN-Her2-Fc и IFN-Pan-Her2-Fc вакцины, а затем проанализировали противоопухолевую активность и иммунологическую активность вакцин *in vivo*.

Материалы и методы:

Материалы:

BALB/c самок мышей (возраст 6-8 недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.; TUBO клетки получали от TCGA; другие материалы были такими же, как в Примере 3.

Методы:

(1) Способы конструирования слитого белка, конструирования плазмиды и очистки белка были такими же, как в Примерах 1 и 2.

Сначала конструировали плазмиды экспрессии для доменов III и IV внеклеточного домена мышинового Her2 (соответственно обозначены как: IFN α -3-Fc, IFN α -pan-3-Fc, IFN α -pan-4-Fc и IFN α -4-Fc), а затем экспрессировали и очищали родственные белки в клеточной линии 293F человека. Размер и чистоту белка определяли методом SDS-PAGE и окрашивания кумасси бриллиантовым синим.

(2) Анализ непосредственной противоопухолевой активности IFN α -3-Fc и IFN α -pan-3-Fc

TUBO представляет собой клеточную линию рака молочной железы, полученную от мышей BALB-NeuT, и используемую для исследования роста и лечения Her2-положительного рака молочной железы. Противоопухолевую активность IFN α в белках определяли с использованием TUBO опухолей. Создавали TUBO модель рака молочной железы у мышей, $5 \cdot 10^5$ TUBO клеток подкожно инокулировали мышам BALB/C. Обработку осуществляли раз в неделю, всего 3 раза, когда размер опухоли достигал 50-80мм³. Доза IFN α -3-Fc составляла 10 мкг/мышь, другие лекарственные средства вводили в эквимоллярных количествах и CpG использовали в качестве адъюванта. Измеряли размер опухоли и строили кривую роста опухоли.

(3) Анализ усиления иммуногенности Her2 вакцины посредством IFN α и Pan

Самок мышей BALB/C возраста 6-8 недель инокулировали подкожно содержащими слитый белок HER2 домена V вакцинами 4-Fc, IFN α -4-Fc и IFN α -pan-4-Fc без адъюванта, раз в неделю, всего 3 раза. Доза для иммунизации составляла 10 мкг/мышь для IFN α -4-Fc, и другие белки инокулировали в эквимоллярных количествах. Венозную кровь собирали в день 14 и день 21 после иммунизации и определяли уровень Her2-специфических IgG антител методом ELISA.

Результат:

(1) Как показано на Фиг. 23, размер слитого белка Her2 по существу соответствовал ожидаемому, и чистота была подходящей для требований эксперимента. IFN α -3-Fc (62,6кДа), IFN α -pan-3-Fc (63,9кДа), IFN α -pan-4-Fc (74,9кДа) и IFN α -4-Fc (73,6кДа). В денатурирующих условиях белки находились в димерном состоянии, соответствуя характеристикам автоматической димеризации Fc-фрагментов.

(2) Как показано на Фиг. 24, по сравнению с контрольной группой внутриопухолевая инъекция Her2 слитых белков IFN α -pan-3-Fc и IFN α -3-Fc значительно ингибировала рост опухолей TUBO, и эффект был сопоставим с эффектом в группе IFN α -Fc. Приведенные выше результаты показали, что активность IFN α в белковой вакцине была хорошей и на нее не влияли такие факторы, как стерические затруднения, которые можно использовать для дальнейшего изучения его эффективности и его механизма в противоопухолевом иммунитете.

(3) Как показано на Фиг. 25, по сравнению с контрольной группой все 4-Fc, IFN α -4-Fc и IFN α -pan-4-Fc могли индуцировать значительный Her2-специфический ответ IgG антител на 14-й и 21-й день после иммунизации; при этом IFN α -4-Fc и IFN α -pan-4-Fc индуцировали тенденцию к увеличению титров антител по сравнению с 4-Fc. Более того, на 21-й день после иммунизации титр антител, индуцированных IFN α -pan-4-Fc, был значительно выше, чем в группе 4-Fc. Приведенные выше результаты показали, что добавление IFN α и pan может способствовать повышению иммуногенности 4-Fc и индуцировать более сильный ответ антиген-специфических антител, и, таким образом, IFN-Pan-HER2-Fc и IFN-Pan-HER2-Fc являются потенциальными эффективными противоопухолевыми вакцинами против Her2-положительных опухолей.

Пример 16

Материалы: BALB/c самок мышей (возраст 6-8 недель) закупили у Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.; HA1 (A/PR8) белок, используемый в ELISA, закупили у Beijing Sino Biological Technology Co., Ltd.; HA1 белок для иммунизации (A/PR8) закупили у Beijing Sino Biological Technology Co., Ltd.; IFN α -HA1-Fc получали на месте; вирусы гриппа H1N1 (A/PR8), используемые для инфицирования мышей, получали на месте; другие используемые в экспериментах материалы были такими же, как в Примере 3.

Методы:

(1) Способы конструирования IFN α -HA1-Fc белка, конструирования плазмиды и очистки белка были такими же, как в Примерах 1 и 2.

(2) Иммунизация мышей белками HA1 и IFN α -HA1-Fc. 10 мкг IFN α -HA1-Fc или такое же молярное количество белка HA1 соответственно смешивали с 20 мкг алюминиевого адьюванта в течение ночи, а затем инокулировали мышам путем внутримышечной иммунизации, а бустер-иммунизацию осуществляли через 14 дней после первоначальной инокуляции. Сыворотку мышей собирали на 28-й день после иммунизации и определяли уровень HA1-специфических антител в мышинной сыворотке методом ELISA.

(3) Определение антител к HA1 в сыворотке. Покрытие антигеном: покрывающий раствор HA1 (2 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Corning 9018) при 100 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет блокировали с использованием 100 мкл 5% блокирующего раствора (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000...), добавляли в блокированный ELISA планшет при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимышиный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS) при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB при 100 мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут, ожидая проявления цвета субстратом. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄), чтобы остановить проявление цвета, и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD₄₅₀₋₆₃₀. Расчет титра: выбирали максимальный коэффициент разведения, который был положительным, и коэффициент разведения умножали (X) на значение OD/пороговое значение (0,1), соответствующее коэффициенту разведения, и полученное значение представляло собой титр антитела, соответствующий сыворотке.

(4) В день 42 после иммунизации мышей подвергали анестезии и инфицировали 1000 БОЕ вируса гриппа A/PR8 путем закапывания в нос. С третьего дня после инфицирования мышей наблюдали и взвешивали через каждые два дня.

Результат:

Как показано на Фиг. 26, после экспрессии и очистки белка результат определения размера и чистоты белка методом SDS-PAGE показал единственную полосу в положении представляющего интерес размера полосы. Как показано на Фиг. 27, IFN α -HA1-Fc может

индуцировать более высокий титр HA1-специфических антител, чем белок HA1 (Фиг. 27a), указывая на то, что вакцинная платформа может повышать иммуногенность белка HA1. После того, как мышей подвергли контрольному заражению, наблюдалось значительное изменение их массы тела. Однако по сравнению с группой, получавшей PBS, и группой, иммунизированной белком HA1, масса тела мышей в группе, иммунизированной IFN α -HA1-Fc, быстро восстанавливалась, показывая, что иммунизация вакциной IFN α -HA1-Fc продемонстрировала хорошую защиту от инфекции гриппа (Фиг. 27b).

Пример 17

Материалы и методы:

Конструкции, способы конструирования плазмид и очистки белков IFN α -Pan-VZV-gE-Fc, IFN α -Pan-EBV-gp350-Fc и IFN α -Pan-HSV-2-gD-Fc были такими же, как в Примерах 1 и 2.

Результат:

Как показано на Фиг. 28, после экспрессии и очистки IFN α -Pan-VZV-gE-Fc, IFN α -Pan-EBV-gp350-Fc и IFN α -Pan-HSV-2-gD-Fc слитых белков результаты определения размера и чистоты белка методом SDS-PAGE показали, что представляющие интерес полосы находились в нужных положениях.

Литература

- [1] WHO W. Global hepatitis report 2017 [J]. Geneva: World Health Organization, 2017,
- [2] RAZAVI-SHEARER D, GAMKRELIDZE I, NGUYEN M H, et al. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study [J]. The lancet Gastroenterology & hepatology, 2018, 3(6): 383-403.
- [3] SCHWEITZER A, HORN J, MIKOLAJCZYK R T, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013 [J]. The Lancet, 2015, 386(10003): 1546-55.
- [4] VOS T, ABAJOBIR A A, ABATE K H, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. The Lancet, 2017, 390(10100): 1211-59.
- [5] KRAMMER F, SMITH G J D, FOUCHIER R A M, et al. Influenza [J]. Nature reviews Disease primers, 2018, 4(1): 3.
- [6] HANNOUN C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines [J]. Expert review of vaccines, 2013, 12(9): 1085-94.
- [7] HOUSER K, SUBBARAO K. Influenza vaccines: challenges and solutions [J]. Cell host & microbe, 2015, 17(3): 295-300.
- [8] HU B, GUO H, ZHOU P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 1-14.
- [9] LURIE N, SAVILLE M, HATCHETT R, et al. Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed [J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(21): 1969-73.
- [10] LI Q, WU J, NIE J, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral

infectivity and antigenicity [J]. *Cell*, 2020, 182(5): 1284-94. e9.

[11] KONTERMANN R E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics [J]. *Current opinion in biotechnology*, 2011, 22(6): 868-76.

[12] MEKHAIEL D N, CZAJKOWSKY D M, ANDERSEN J T, et al. Polymeric human Fc-fusion proteins with modified effector functions [J]. *Scientific reports*, 2011, 1(1): 1-11.

[13] ROOPENIAN D C, AKILESH S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. *Nature reviews immunology*, 2007, 7(9): 715-25.

[14] VILCEK J. Fifty years of interferon research: aiming at a moving target [J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 343-8.

[15] BRACCI L, LA SORSA V, BELARDELLI F, et al. Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer [J]. *Expert review of vaccines*, 2008, 7(3): 373-81.

[16] HAHM B, TRIFILO M J, ZUNIGA E I, et al. Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling [J]. *Immunity*, 2005, 22(2): 247-57.

[17] ITO T, AMAKAWA R, INABA M, et al. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs [J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(5): 2961-9.

[18] MONTOYA M, SCHIAVONI G, MATTEI F, et al. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation [J]. *Blood*, 2002, 99(9): 3263-71.

[19] LE BON A, ETCHART N, ROSSMANN C, et al. Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon [J]. *Nature immunology*, 2003, 4(10): 1009-15.

[20] LE BON A, DURAND V, KAMPHUIS E, et al. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8⁺ T cell response during cross-priming [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 176(8): 4682-9.

[21] SPADARO F, LAPENTA C, DONATI S, et al. IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2012, 119(6): 1407-17.

[22] PARLATO S, SANTINI S M, LAPENTA C, et al. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities [J]. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2001, 98(10): 3022-9.

[23] ROUZAUT A, GARASA S, TEIJEIRA Á, et al. Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN- α [J]. *European journal of immunology*, 2010, 40(11): 3054-63.

[24] LE BON A, SCHIAVONI G, D'AGOSTINO G, et al. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo [J]. *Immunity*, 2001, 14(4): 461-70.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина, которая включает слитый белок, содержащий в качестве структурной единицы интерферон-целевой антиген-Fc-область иммуноглобулина (или антитело Ab),

где интерферон является первой структурной единицей, которая может представлять собой интерферон I типа, интерферон II типа и/или интерферон III типа, такой как IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28a), IFN- λ (IL-28b) и IFN- ω ; интерферон может быть получен от человека или мыши; предпочтительно интерферон представляет собой интерферон I типа, такой как IFN- α , такой как мышинный IFN- α 4, человеческий IFN- α 2, мутанты человеческого IFN- α 2 (связывающиеся с рецепторами IFN человека и мыши), например, как показано в SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22,

где целевой антиген является третьей структурной единицей; целевой антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, антиген патогена, такой как вирусный или бактериальный антиген; причем целевой антиген может представлять собой, например, мутантный целевой антиген, отличный от дикого типа, включающий, например, естественные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения, искусственные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения антигенов дикого типа, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций и подтипы, образующиеся после мутаций, где вирус может представлять собой, например, SARS-COV-2, или где целевой антиген может представлять собой, например, полноразмерный или S1 область S белка вируса SARS-COV-2, например, целевой антиген может представлять собой антигены, показанные в SEQ ID NO.76 или SEQ ID NO.77,

где Fc-область иммуноглобулина (или антитело) является второй структурной единицей, которая может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и/или IgM, такую как Fc-область IgG1 и Fc-область, показанную в SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.23 и SEQ ID NO.24 IgG1-Fc-hole и IgG1-Fc-knob, используемых для образования гетеродимера; причем антитело в качестве второй структурной единицы (включающее, например, тяжелую и легкую цепи антитела или одноцепочечные антитела, указанное как Ab) может представлять собой антитела для целенаправленной активации DC, включая анти-PD-L1, анти-DEC205, анти-CD80/86 и другие антитела,

необязательно, вакцина может представлять собой нацеленную вакцину, и слитый белок, необязательно, может также содержать один или более Т-хелперных эпитопов и/или связывающих фрагментов.

2. Вакцина по п.1, где целевой антиген представляет собой вирусный антиген, и вирус может представлять собой, например, HBV, HPV, VZV, EBV, HSV-2, HIV, вирус гриппа, коронавирус, такой как SARS-COV, SARS-COV-2, MERS-CoV, например, указанный антиген может представлять собой антиген HBV, такой как антиген Pres1 HBV, антиген HBsAg или пептидные фрагменты, например, антиген Pres1 HBV подтипа ad или подтипа ay, такой как антиген Pres1 HBV подтипа ad, показанный в SEQ ID NO.6, такой как антиген Pres1 HBV подтипа ay, показанный в SEQ ID NO.26; например, антиген HBsAg HBV (включая различные подтипы и пептидные фрагменты), такой как антиген HBsAg

HBV подтипа adg, показанн в SEQ ID NO.7, такой как антиген HBsAg HBV подтипа adw, показанный в SEQ ID NO.27, такой как антиген HBsAg HBV подтипа ауw, показанный в SEQ ID NO.28; например, антиген может представлять собой, например, антиген SARS-COV-2, такой как антиген RBD SARS-COV2, такой как антиген RBD SARS-COV2, показанный в SEQ ID NO.8; например, антиген вируса гриппа, такой как антиген HA вируса гриппа, такой как антиген HA вируса гриппа, показанный в SEQ ID NO.9; например, антиген HPV, такой как антиген E7 HPV, показанный в SEQ ID NO.10; например, антиген gE, такой как антиген gE вируса опоясывающего герпеса (VZV), показанный в SEQ ID NO.91; например, EBV-gp350, такой как белок gp350 вируса Эпштейна-Барр (EBV), показанный в SEQ ID NO.92; например, антиген gD, такой как антиген gD вируса простого герпеса 2 (HSV-2), показанный в SEQ ID NO.93; указанный антиген может представлять собой, например, EBV EBNA1/LMP2, VZV-IE62, HSV-2 ICPO, антиген gp120 ВИЧ;

где целевой антиген может представлять собой мутантный вирусный антиген, такой как мутант любых вирусных антигенов, такой как мутант SARS-COV-2, включающий, например, естественные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения, искусственные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образующиеся в результате мутаций, происходящие из белка SARS-COV-2 (такого как один или более из S белка, N белка, М белка, Е белка); например, мутантный вирусный антиген может представлять собой мутанты полноразмерного S белка (SEQ ID NO.76), S1 области (SEQ ID NO.77), RBD области (SEQ ID NO. 78) SARS-COV-2 дикого типа; например, мутантный вирусный антиген может включать одну или несколько из следующих мутаций S белка SARS-COV-2: делецию 69-70 NTD области, делецию Y144, делецию 242-244, мутации L18F, D80A, D215, R246I, мутации K417, E484, N501Y, L452R RBD области, мутации D614G, H655Y; например, мутантный вирусный антиген может включать мутации, присутствующие в британском B.1.1.7 (501Y.1) мутантном штамме, южноафриканском B.1.351 (501Y.2) мутантном штамме и бразильском P1 (501Y.3) мутантном штамме, калифорнийском B.1.429 мутантном штамме; например, мутантный вирусный антиген может включать мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82; например, мутантный вирусный антиген может включать мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO. 81, SEQ ID NO.82,

вирусный антиген может быть слит с хелперным полипептидным эпитопом, который экспрессируется для усиления ответа В-клеток и Т-клеток и может быть расположен на N-конце или C-конце антигенного эпитопа, таким как Pan HLA DR-связывающий эпитоп (PADER), такой как аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO. 3;

связывающие фрагменты каждой структурной единицы представляют собой гибкие полипептидные последовательности и могут представлять собой связывающие фрагменты 1 и 2, например, как показано в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO.4 и SEQ

ID NO.25,

N-конец каждой полипептидной последовательности, состоящей из структурных единиц, может включать соответствующий сигнальный пептид, способный промотировать секрецию белка, например, как показано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO.5,

вакцина может быть получена при помощи эукариотических систем экспрессии, например, эукариотической системы экспрессии 293F и клеток CHO.

3. Вакцина по п.1 или 2, где целевой антиген представляет собой опухолевый антиген, такой как белковая молекула, экспрессируемая на высоком уровне опухолевыми клетками, например, антиген может представлять собой рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2/neu) и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); например, белковую молекулу Her2, экспрессируемую на высоком уровне опухолевыми клетками, и ее различные функциональные области и усечения, такие как антигены или их мутанты, показанные в SEQ ID NO. 85, 86, 97, 88, 89, 90.

4. Вакцина по любому из пп. 1-3, где слитый белок представляет собой гомодимерный или гетеродимерный слитый белок, необязательно слитый белок также может включать один или более эпитопов хелперных Th-клеток и/или связывающих фрагментов в любой одной или двух цепях (т.е. первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи) гомодимера или гетеродимера,

необязательно, гомодимерный слитый белок включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь являются идентичными, например, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь каждая включает IFN, целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина (или Ab) последовательно от N-конца к C-концу, или эти три структурные единицы соединены в любом порядке с образованием гомодимера; предпочтительно первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь каждая включает IFN, целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина (или Ab) последовательно от N-конца к C-концу; слитый белок также может включать эпитоп хелперной Th-клетки;

необязательно, гетеродимерный слитый белок включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь являются разными, например, первая полипептидная цепь может включать IFN и Fc-область иммуноглобулина (или Ab) последовательно от N-конца к C-концу, или включать Fc-область иммуноглобулина (или Ab) и IFN последовательно от N-конца к C-концу; вторая полипептидная цепь может включать целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина (или Ab), при этом целевой антиген может быть расположен на N-конце, а Fc-область иммуноглобулина (или Ab) может быть расположена на C-конце, или Fc-область иммуноглобулина (или Ab) может быть расположена на N-конце, а целевой антиген может быть расположен на C-конце; или эти три структурные единицы соединены в любом порядке с образованием гетеродимера; предпочтительно IFN и целевой антиген соответственно расположены на N-конце двух полипептидов, а Fc-область

иммуноглобулина (или Ab) расположена на С-конце двух полипептидов; слитый белок также может включать эпитоп хелперной Th-клетки.

5. Вакцина по п.4, где

1) первый полипептид и второй полипептид гомодимера могут включать аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO.11, 12, 13, 14, 29, 30, 31, 32, 38, 39, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 59, 58, 65, 66, 67, 68,

2) первый полипептид гетеродимера может включать аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO.15, 33, 42, 51, 60 и 69, а второй полипептид может включать аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO. 16, 17, 18, 19, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 55, 61, 62, 63, 64, 70, 71, 72, 73,

3) антитело может включать нацеленные на DC антитела, антитела, блокирующие иммунные контрольные точки, иммуноактивирующие антитела и т.д., например, вакцины, содержащие анти-PD-L1 антитело (SEQ ID NO.20), анти-DEC205 антитело, анти-CD80/86 антитело и т.д.

6. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок в вакцине по любому из пп. 1-5, вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, или клетка-хозяин, такая как эукариотическая клетка, включающая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии.

7. Применение слитого белка в вакцине по любому из пп. 1-5 для получения композиции или набора, например, фармацевтической или иммуногенной композиции или набора, рекомбинантного микроорганизма или клеточной линии.

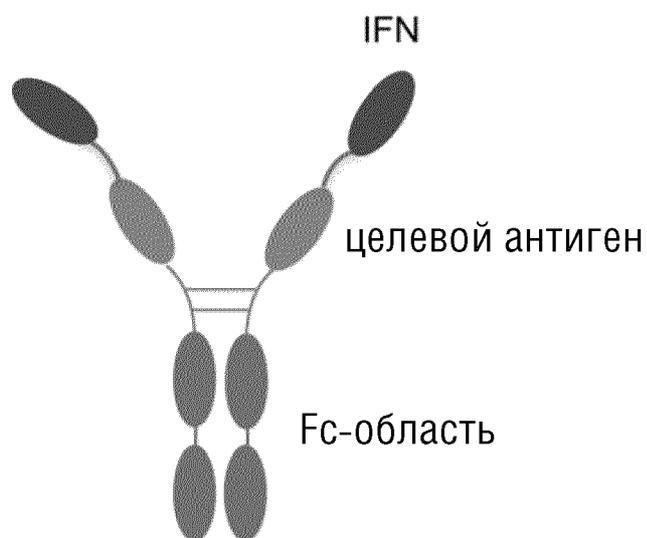
8. Применение по п.7, где композицию или набор используют для профилактики или лечения опухолей или патогенов, например, профилактики или лечения вирусов или бактерий, где вирусы могут представлять собой HBV, HPV, EBV, вирус гриппа, ВИЧ, коронавирусы, такие как SARS-COV, SARS-COV-2, MERS-CoV; например, композицию или набор используют в качестве профилактической или терапевтической вакцины против гепатита В, HBV, гриппа, SARS-COV2, HPV, HPV-связанных опухолей, EBV, EBV-связанных опухолей или ВИЧ.

9. Вакцина по любому из пп. 1-5 или применение по п.7 или 8, где вакцину, композицию или набор можно инокулировать внутримышечным, внутривенным, чрескожным, подкожным или назальным или другими путями иммунизации, при этом вакцина, композиция или набор также могут включать адъювант, и адъювант может включать алюминиевый адъювант (Alum), лиганд активатора Toll-подобного рецептора 4 MPLA, лиганд Toll-подобного рецептора 9, олигодезоксинуклеотид (CpG-ODN), M59 и адъювант Фрейнда.

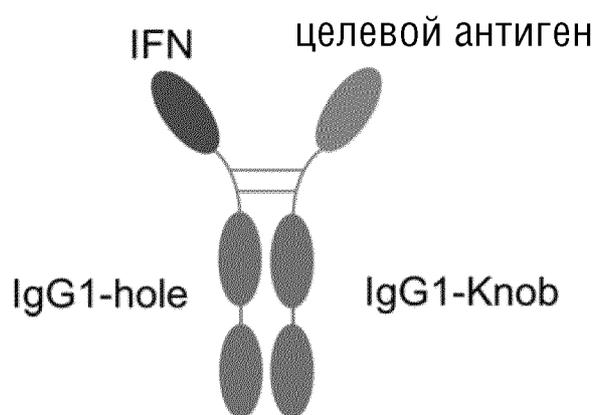
10. Вакцина по любому из пп. 1-5 или применение по п.7 или 8, где вакцину можно использовать в комбинации с другими профилактическими или терапевтическими терапиями; например, вакцина может представлять собой терапевтическую вакцину против HBV, которую можно использовать в комбинации с другим профилактическим или терапевтическим лечением HBV, например, терапевтическую вакцину против HBV можно

использовать в комбинации с вакциной на основе белка оболочки HBsAg вируса гепатита В, например для лечения хронического вирусного гепатита В, например, терапевтическую вакцину против HBV можно комбинировать с нуклеозидными или нуклеотидными аналогами, например для лечения хронического вирусного гепатита В, например, профилактические или терапевтические вакцины против гриппа, SARS-COV2, HPV, EBV, ВИЧ можно использовать в комбинации с противовирусными лекарственными средствами и другими методами лечения; профилактические или терапевтические вакцины против HPV, EBV-связанных опухолей можно использовать в комбинации с противовирусными и противоопухолевыми лекарственными средствами и терапиями; например, вакцину по любому из пп. 1-5 можно комбинировать с другими вакцинами против вирусов или патогенов или опухолей для получения мультивалентной вакцины, например, вакцину против SARS-COV-2 по любому из пп. 1-5 можно комбинировать с другими вакцинами, такими как вакцина против гриппа, для получения мультивалентной вакцины; например, вакцину по любому из пп. 1-5 и аденовирусную вакцину, или мРНК-вакцину, или инактивированную вакцину, или ДНК-вакцину против того же вируса, патогена или опухоли вводят последовательно или одновременно, например, вакцину на основе слитого белка SARS-CoV-2 и аденовирусную вакцину, или мРНК-вакцину, или инактивированную вакцину, или ДНК-вакцину против SARS-COV-2 вводят последовательно или одновременно, например последовательность вакцинации может быть следующей: 1) сначала вакцина на основе слитого белка SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, а затем аденовирусная вакцина, или мРНК-вакцина, или инактивированная вакцина, или ДНК-вакцина против SARS-COV-2; 2) сначала аденовирусная вакцина, или мРНК-вакцина, или инактивированная вакцина, или ДНК-вакцина против SARS-COV-2, а затем вакцина на основе слитого белка SARS-CoV-2; 3) вакцину на основе слитого белка SARS-CoV-2 и аденовирусную вакцину, или мРНК-вакцину, или инактивированную вакцину, или ДНК-вакцину против SARS-COV-2 вводят одновременно.

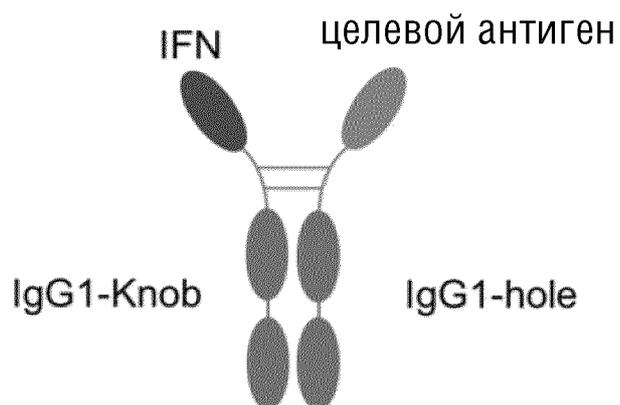
ФИГ.1



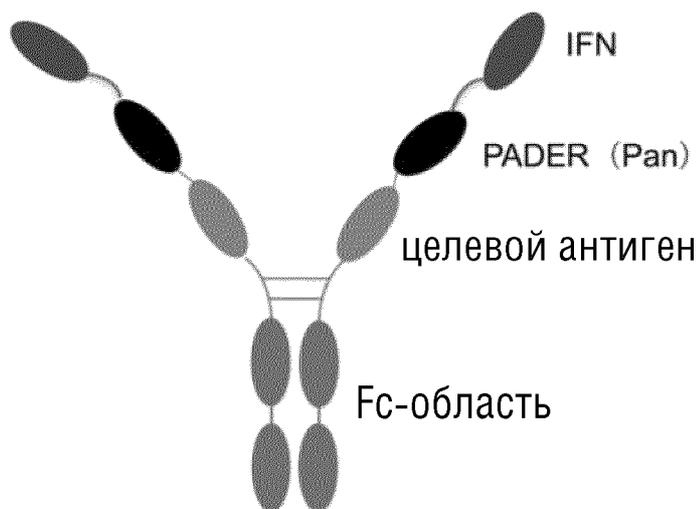
ФИГ.2



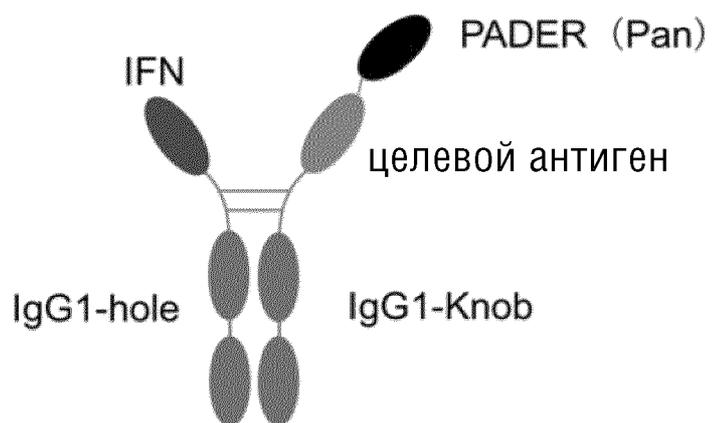
ФИГ.3



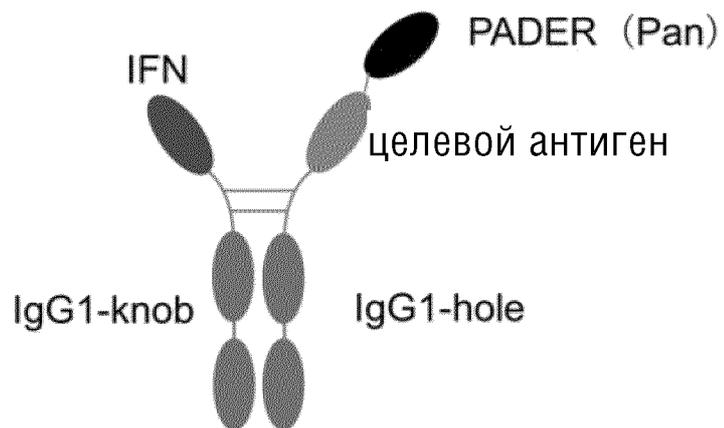
ФИГ.4



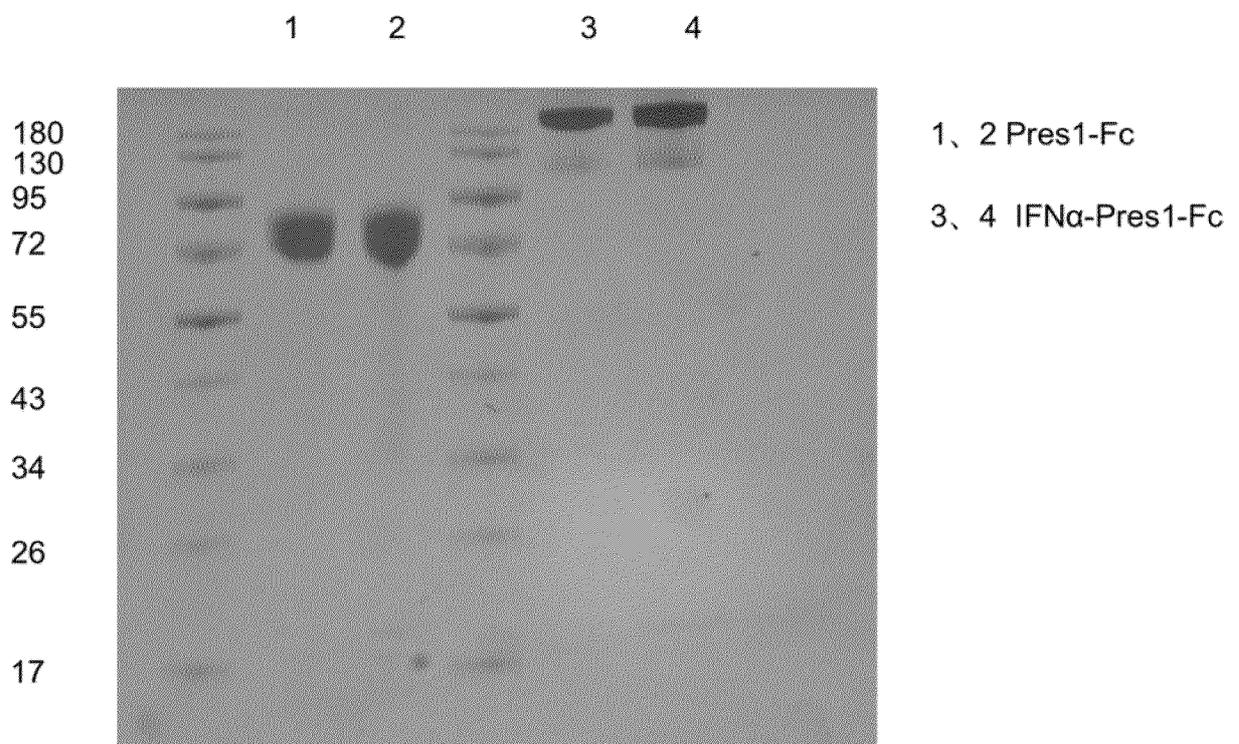
ФИГ.5



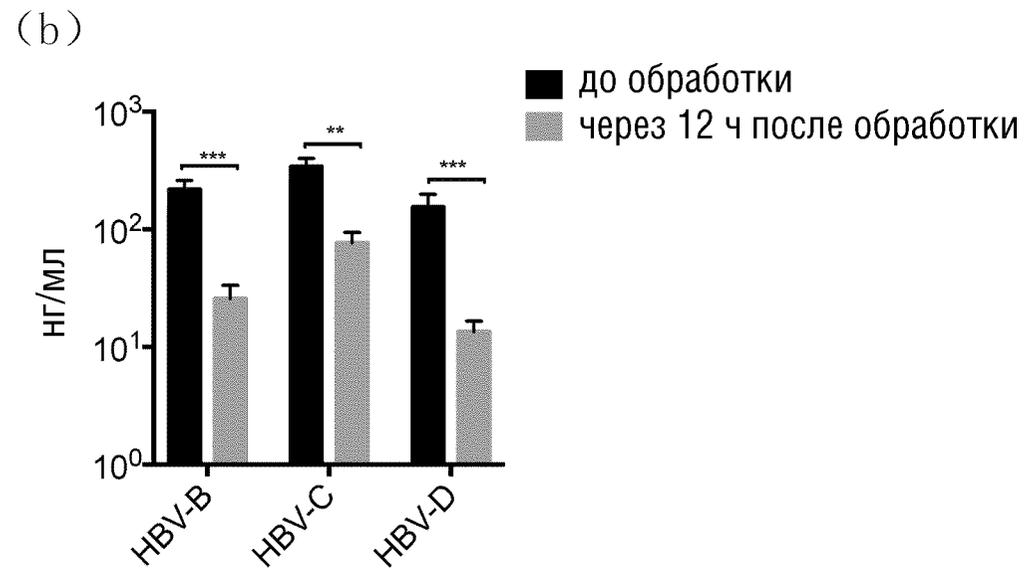
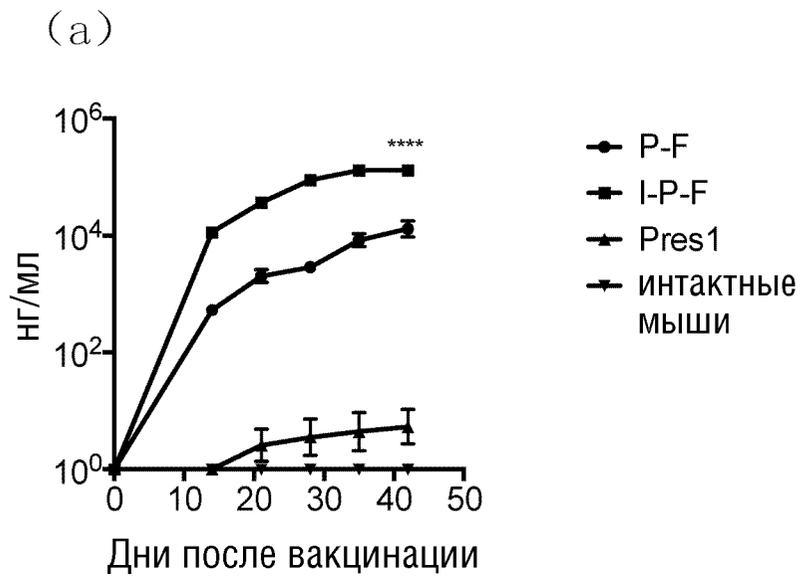
ФИГ.6



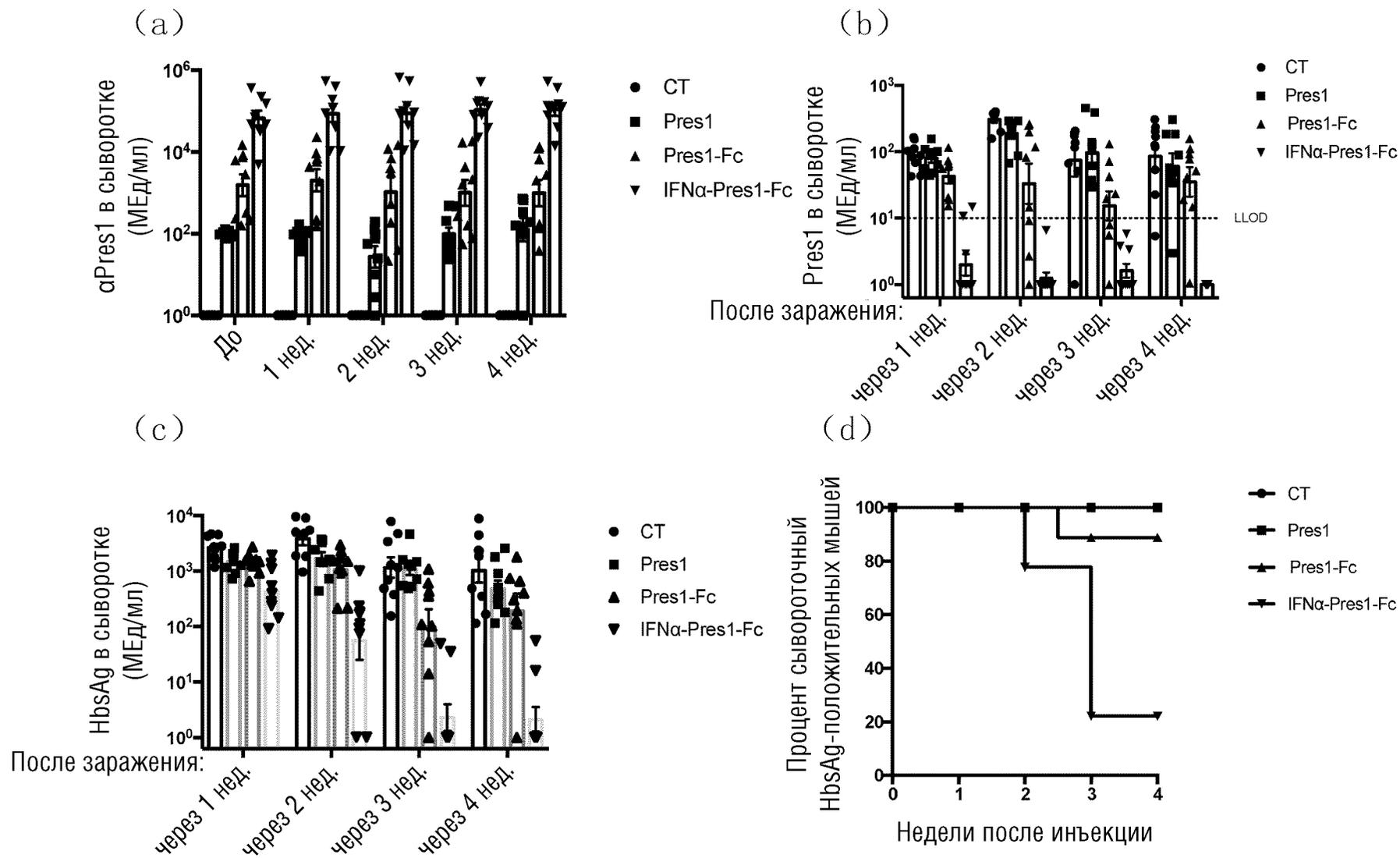
ФИГ.7



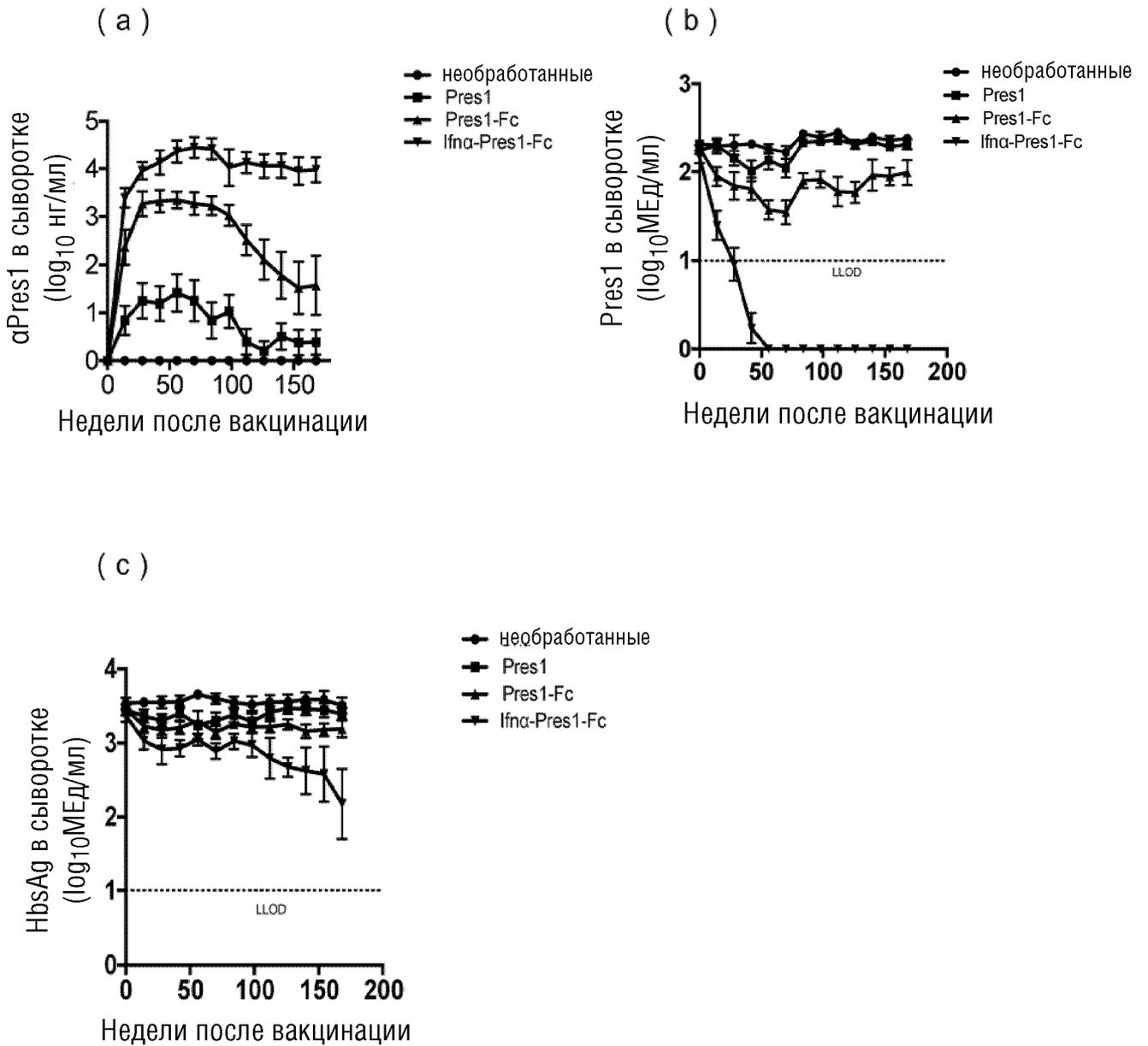
ФИГ.8



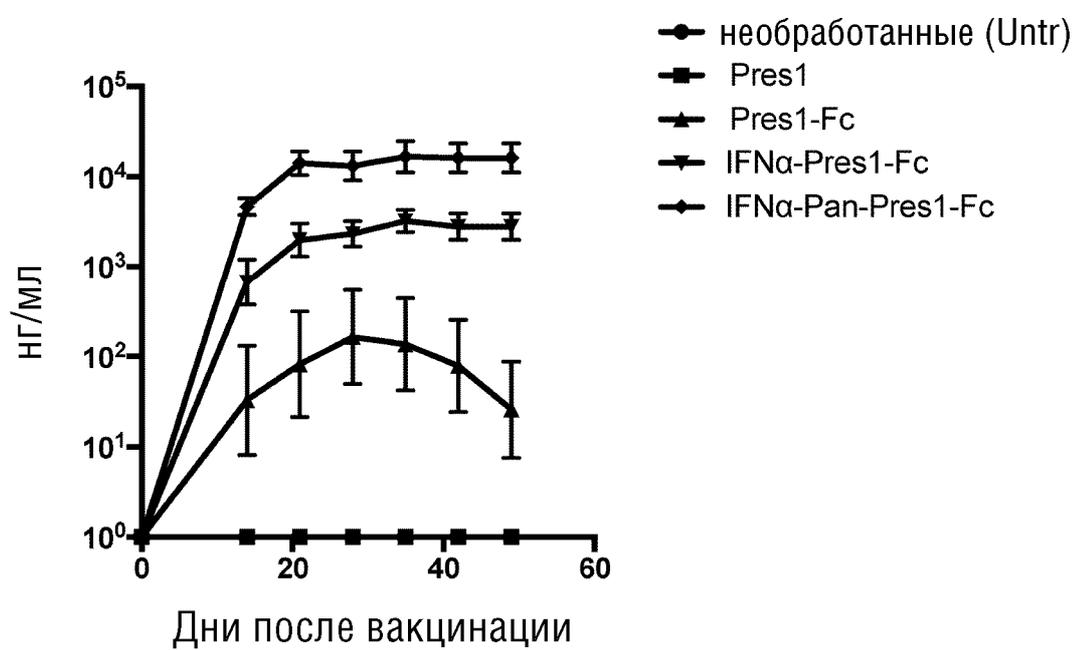
ФИГ.9



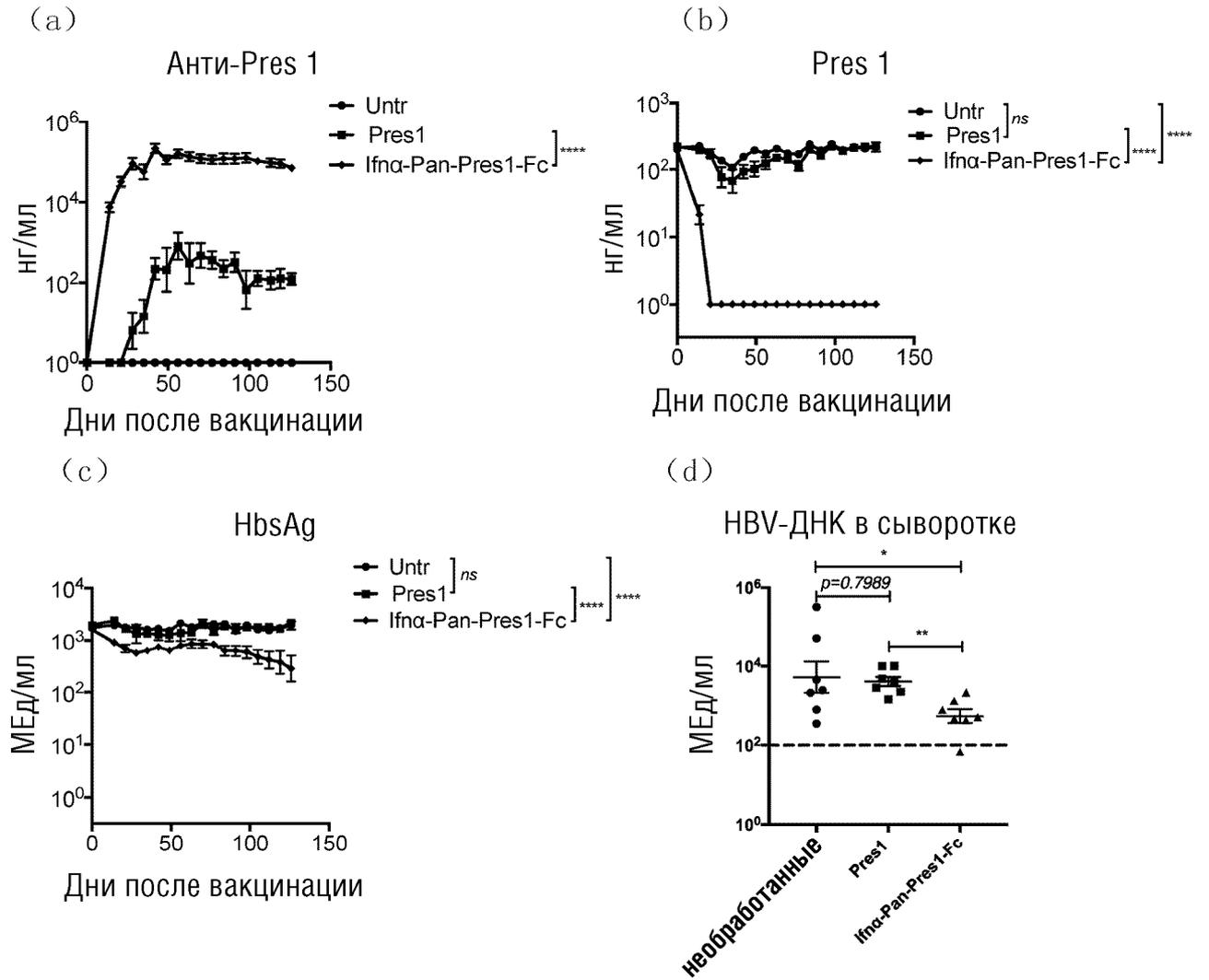
ФИГ.10



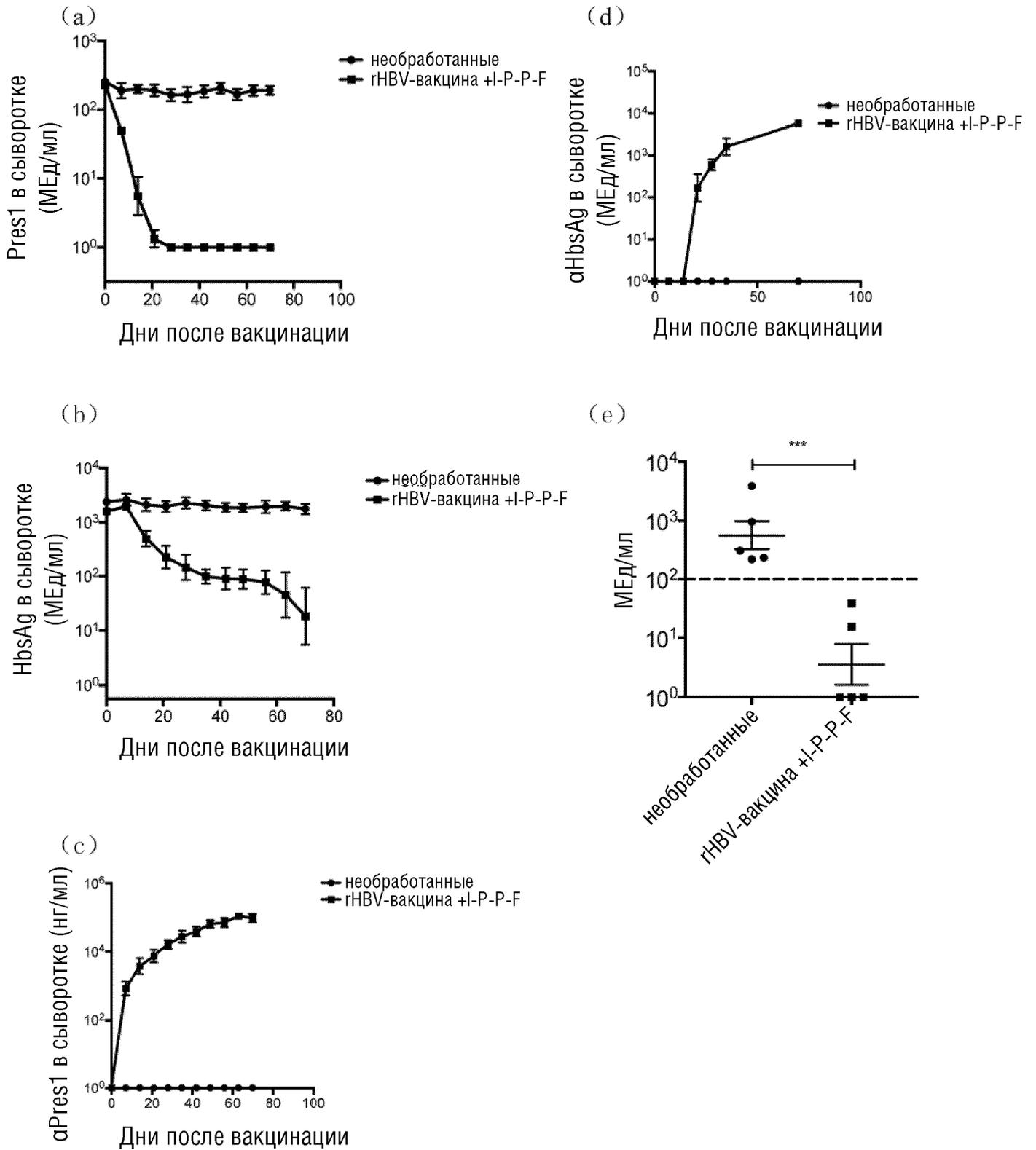
ФИГ.11



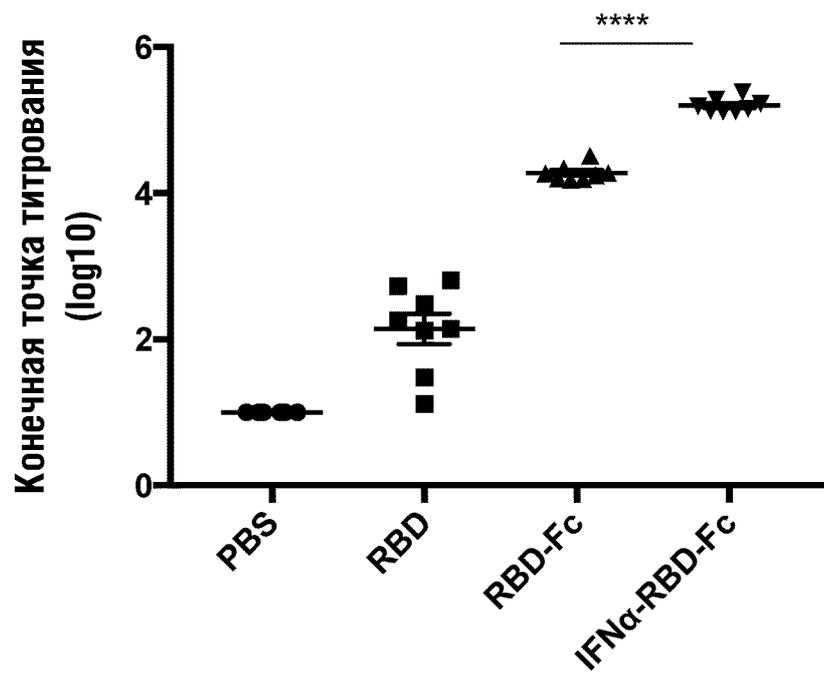
ФИГ.12



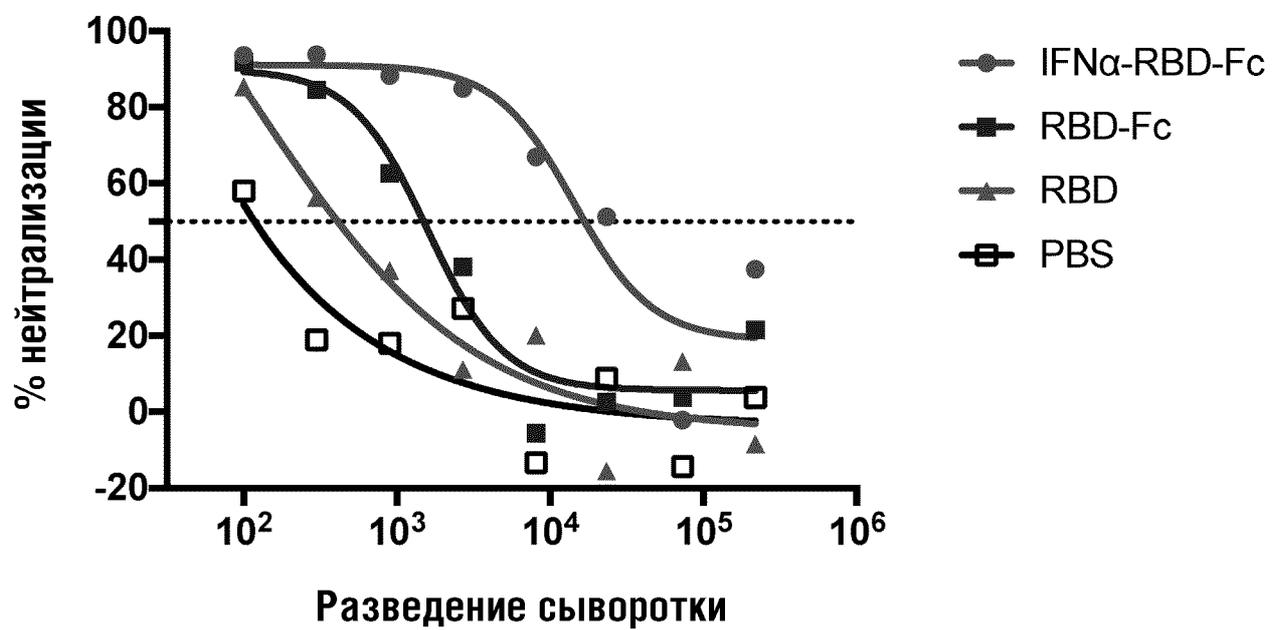
ФИГ.13



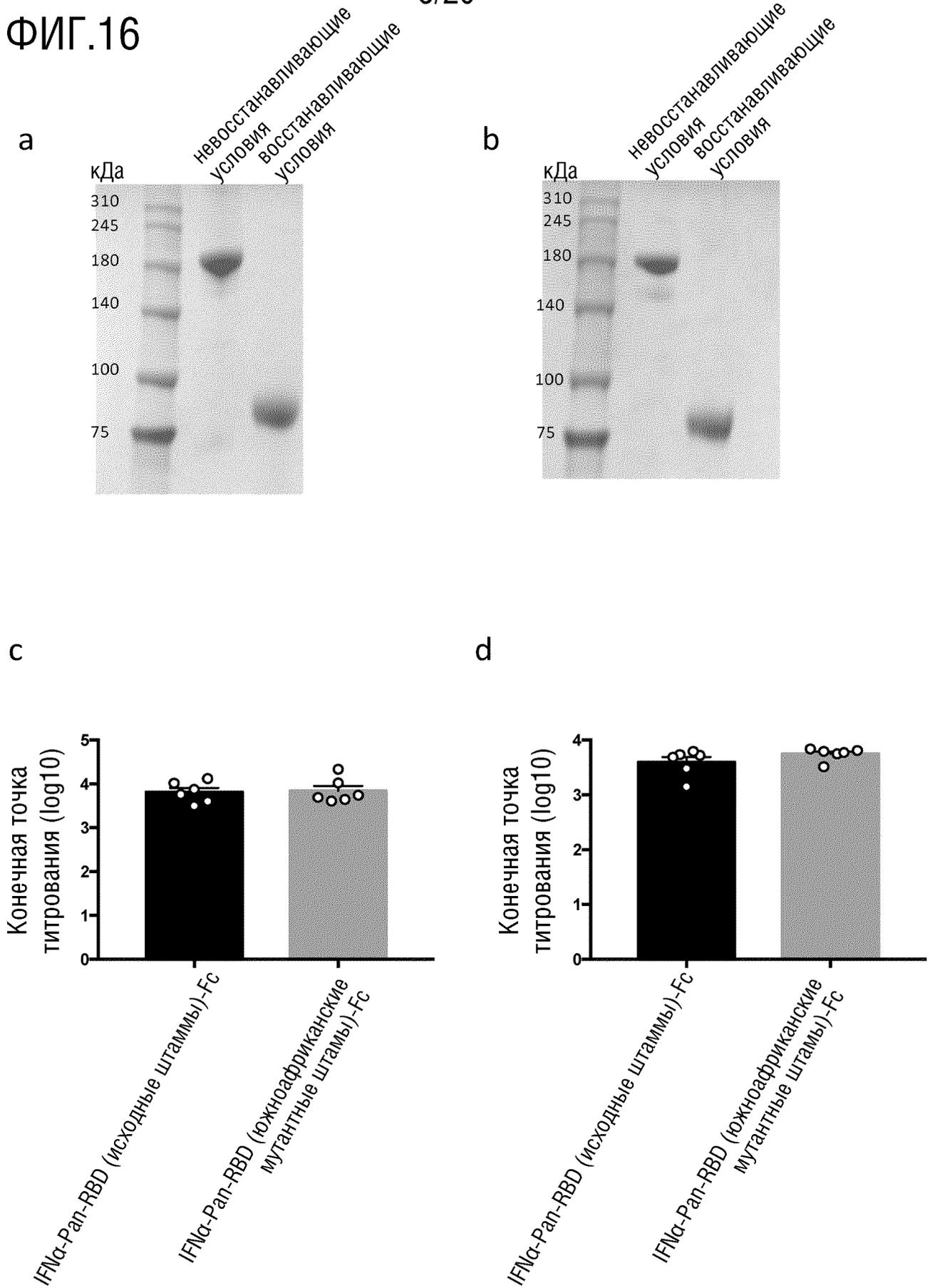
ФИГ.14



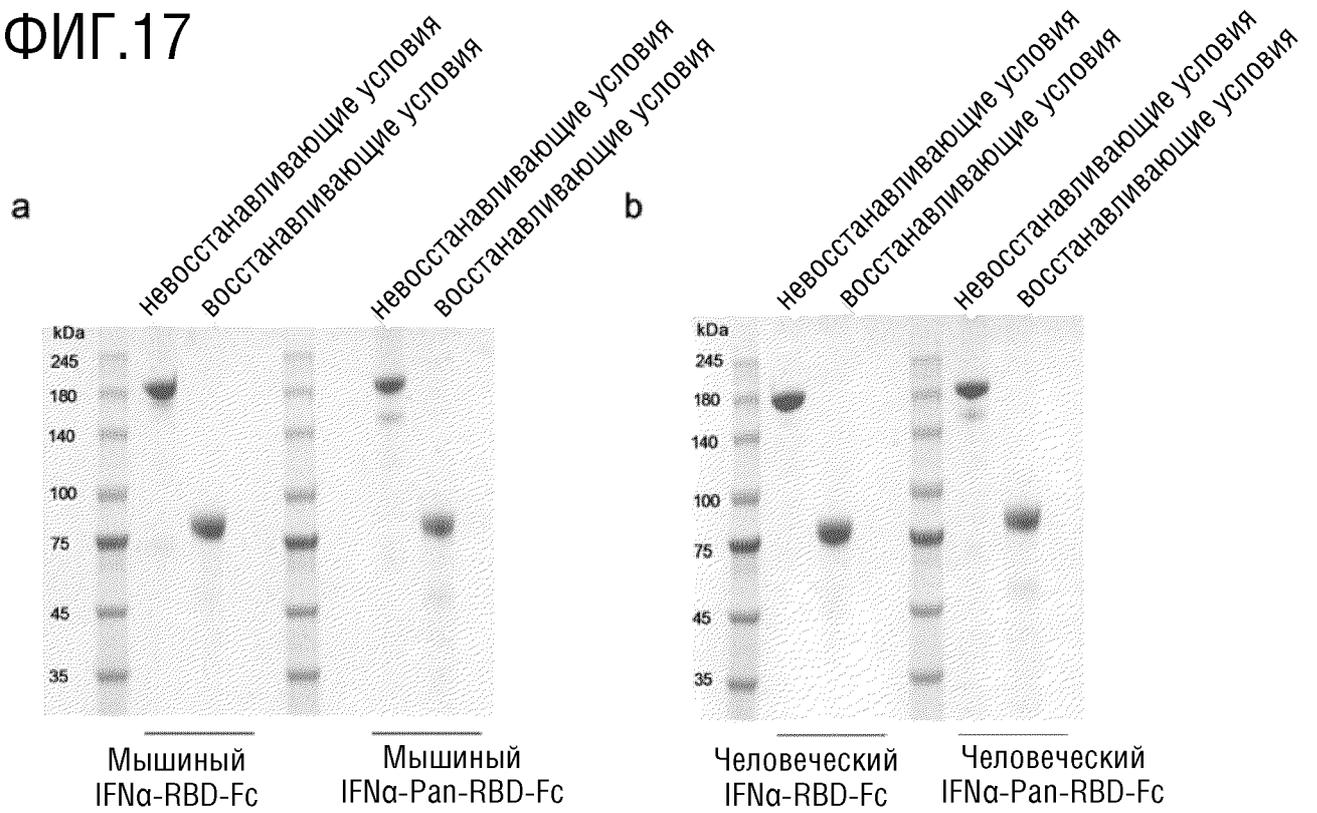
ФИГ.15



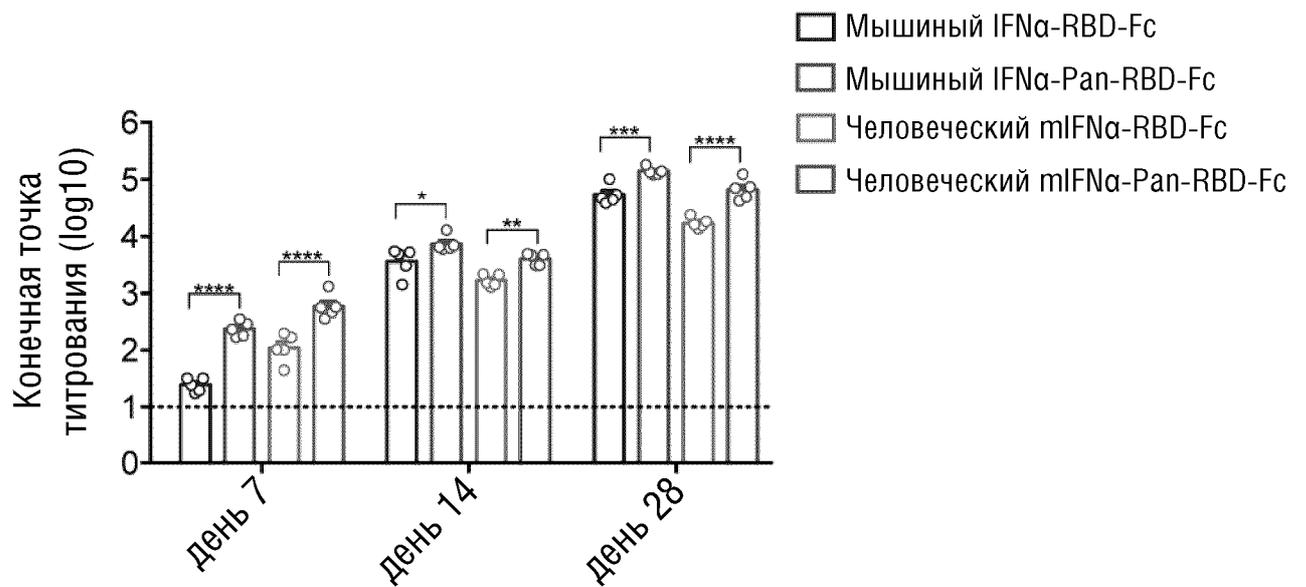
ФИГ.16



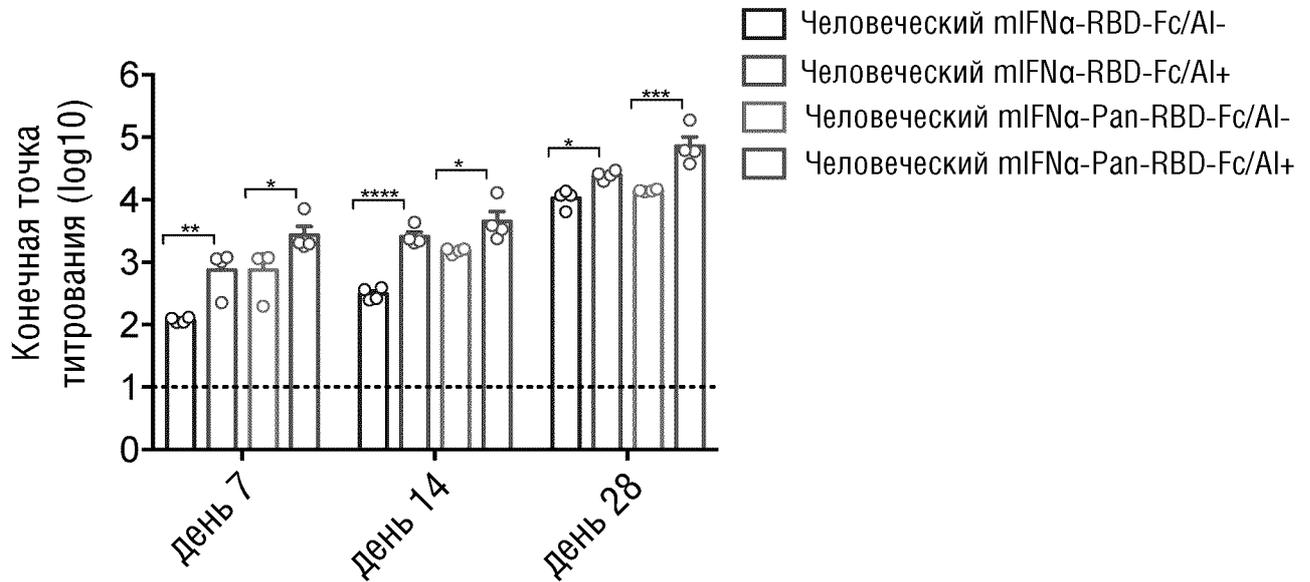
ФИГ.17



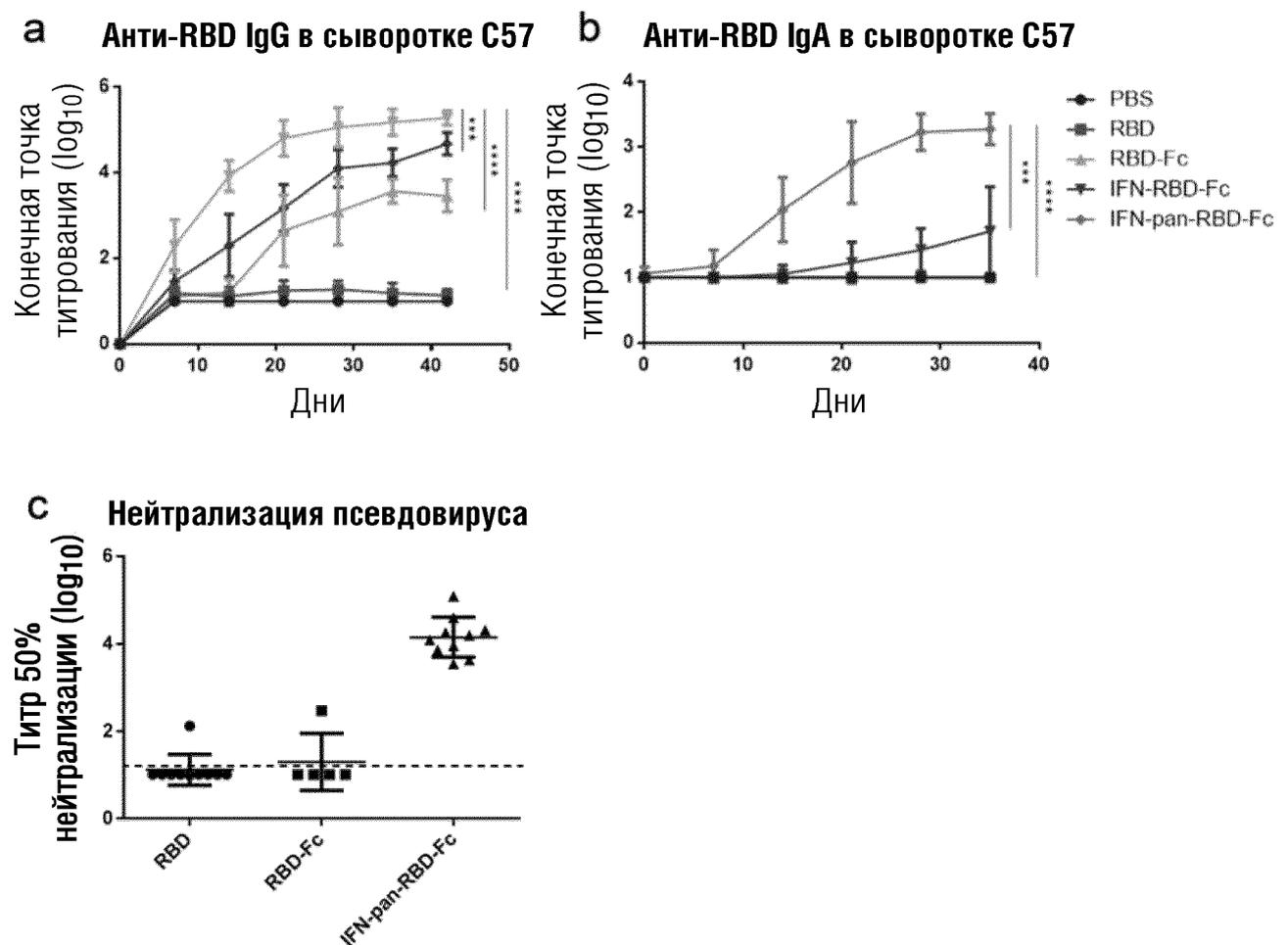
ФИГ.18



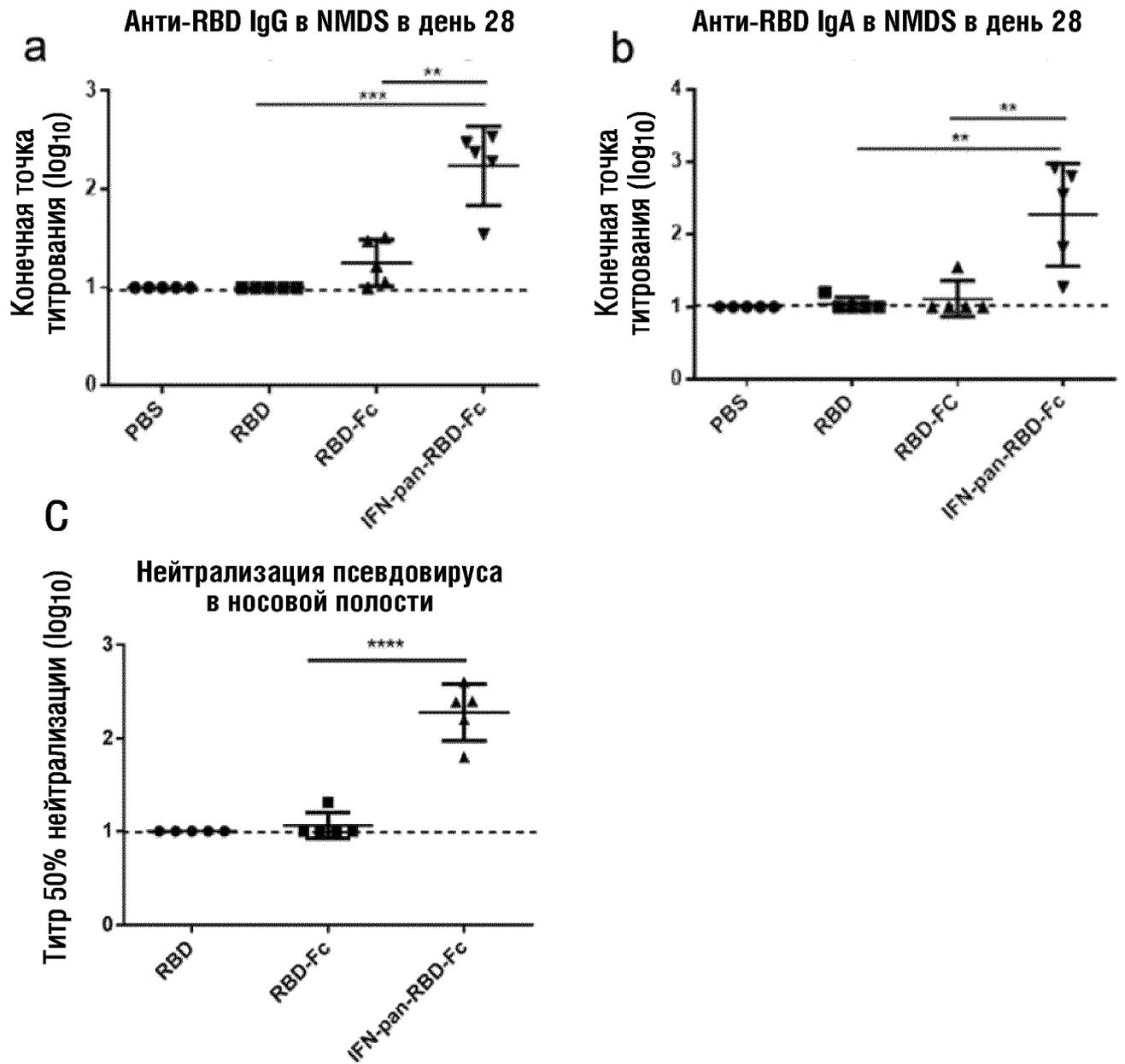
ФИГ.19



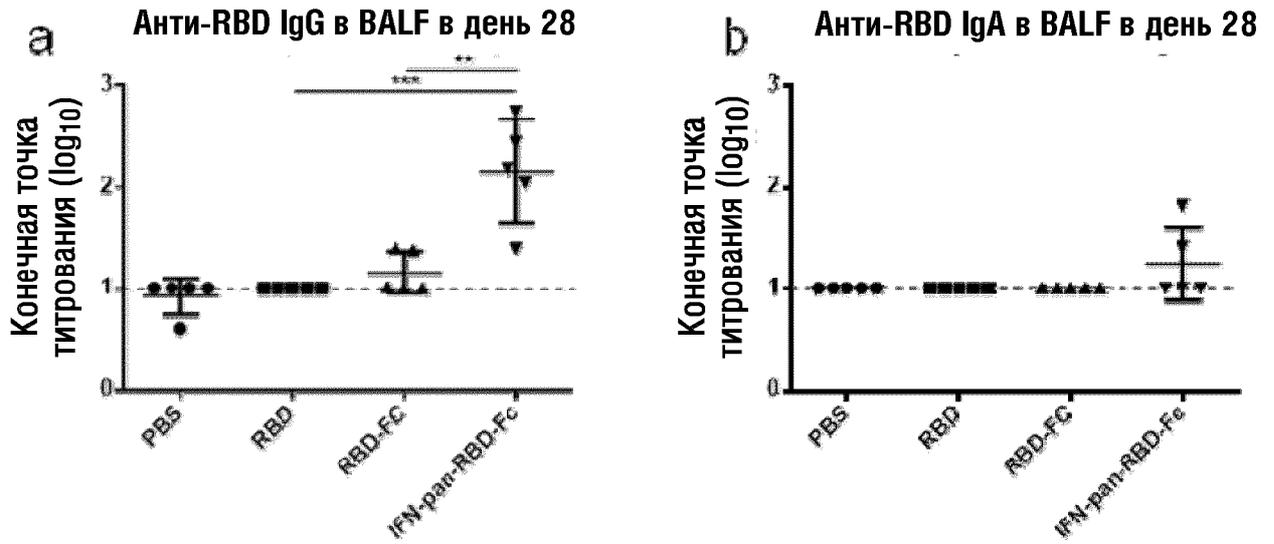
ФИГ.20



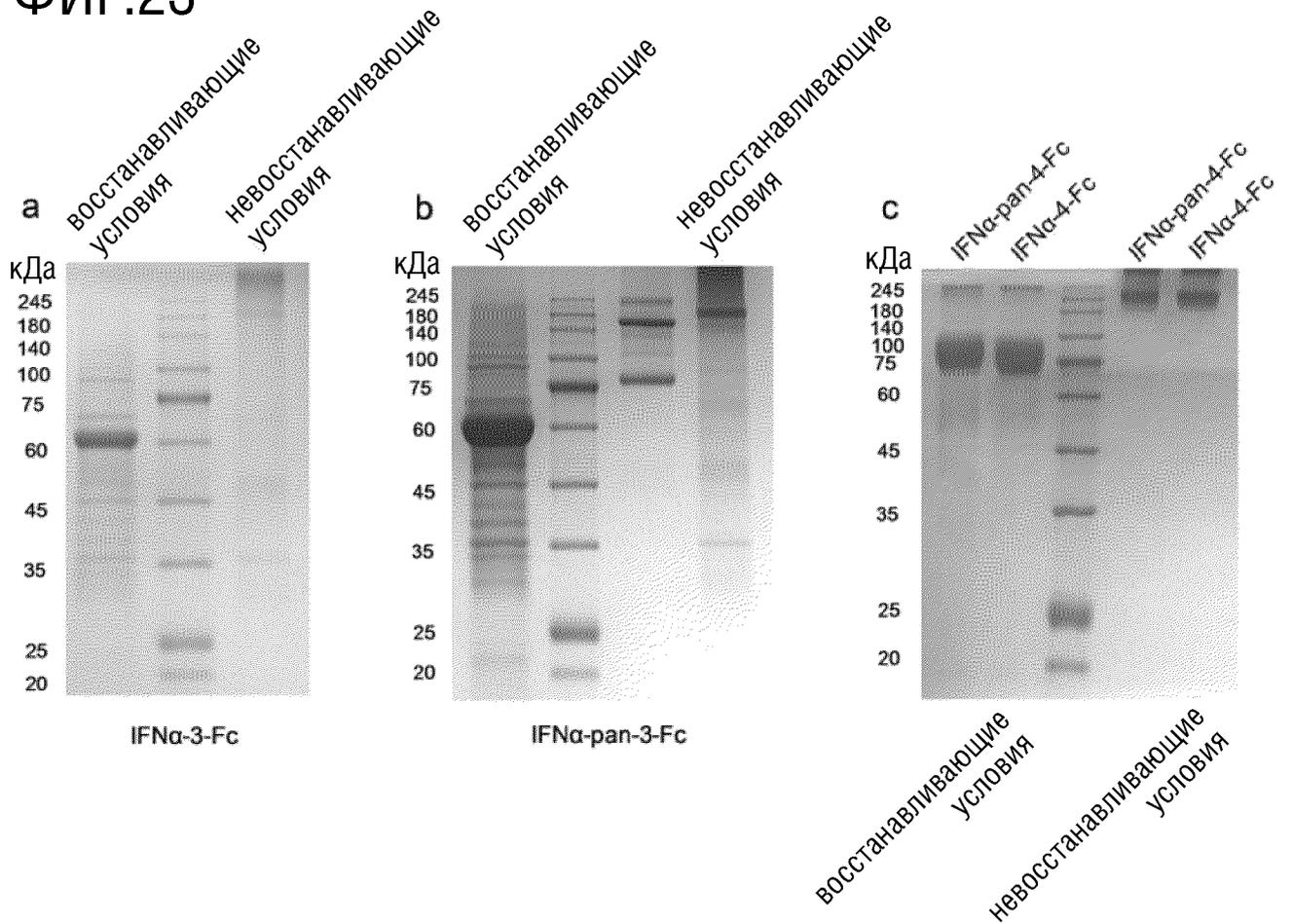
ФИГ.21



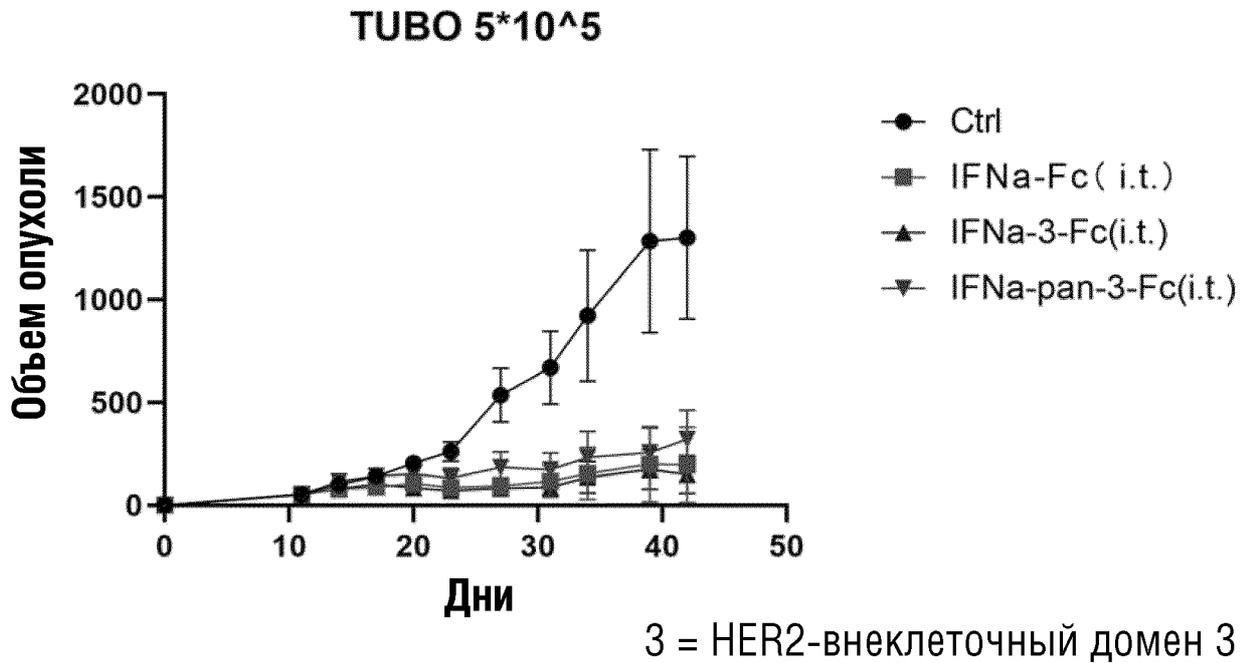
ФИГ.22



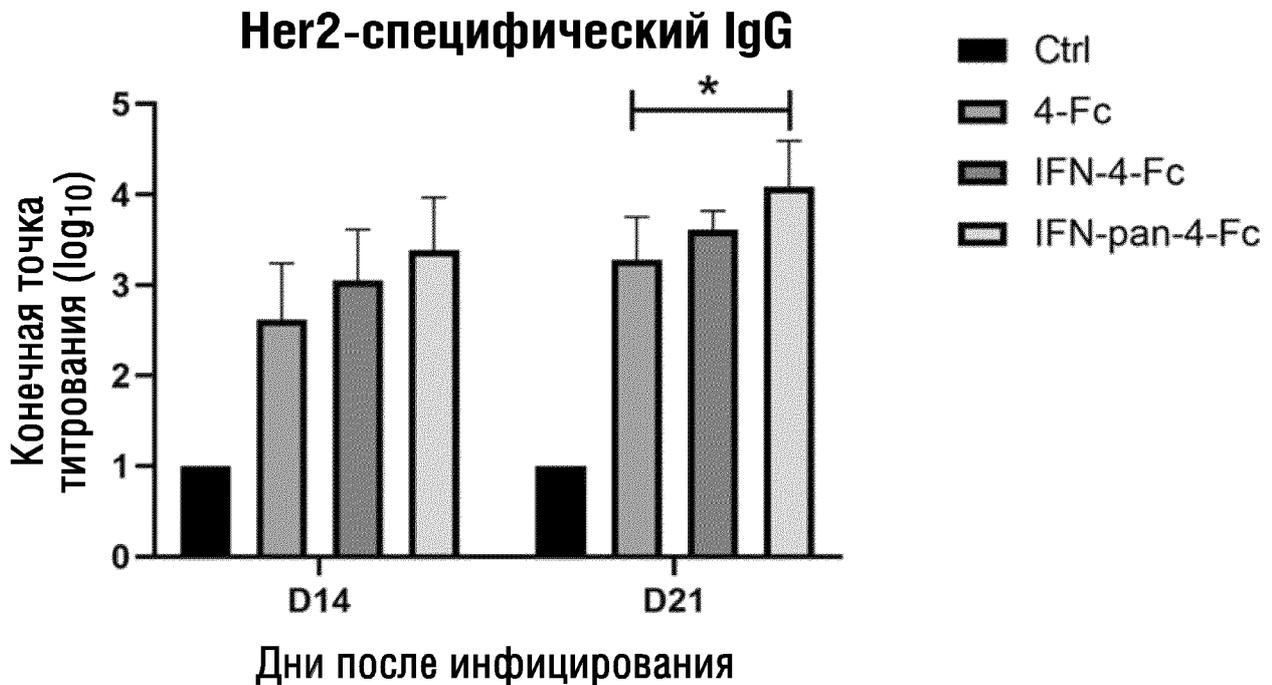
ФИГ.23



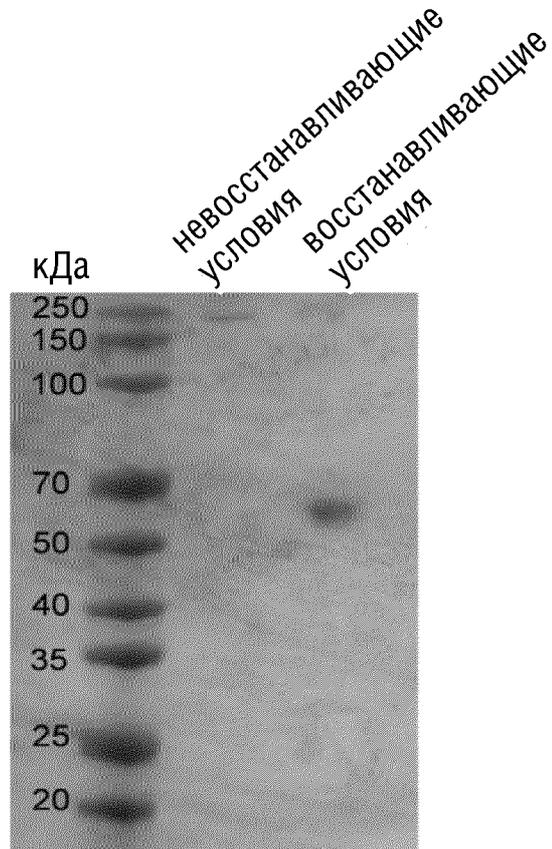
ФИГ.24



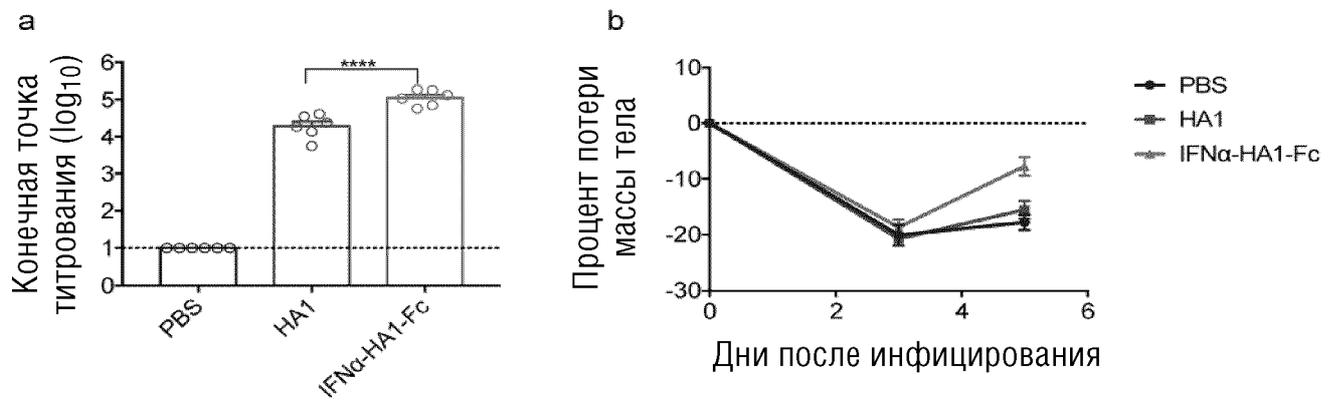
ФИГ.25



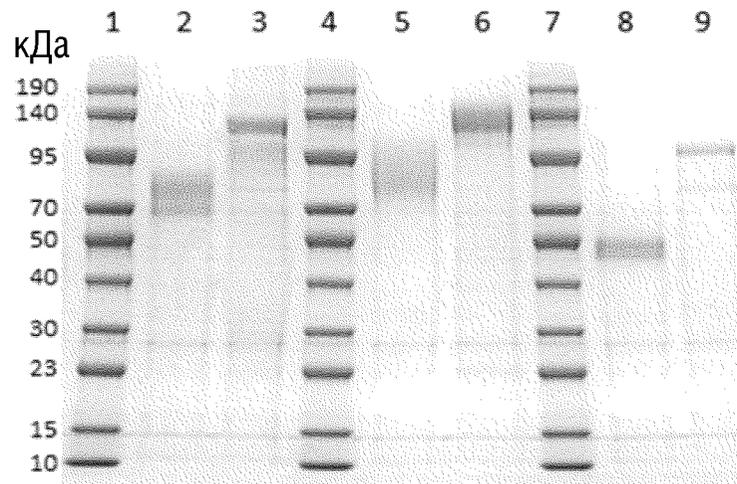
ФИГ.26



ФИГ.27



ФИГ.28



1. Маркер
2. VZV-gE
3. IFNa-Pan-VZV-gE-Fc
4. Marker
5. EBV-GP350
6. IFNa-Pan-EBV-GP350-Fc
7. Маркер
8. HSV-2-gD
9. IFNa-Pan-HSV-2-gD-Fc