

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391068 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.29

(51) Int. Cl. A61K 47/64 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.05

(54) КОВАЛЕНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-CoV-2 И БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 2020-0069

(32) 2020.10.05

(33) CU

(86) PCT/CU2021/050009

(87) WO 2022/073528 2022.04.14

(71) Заявитель:

ИНСТИТУТО ФИНЛИ ДЕ
ВАКУНАС; СЕНТРО ДЕ
ИНМУНОЛОГИА МОЛЕКУЛАР;
УНИВЕРСИДАД ДЕ ЛА ХАБАНА
(CU)

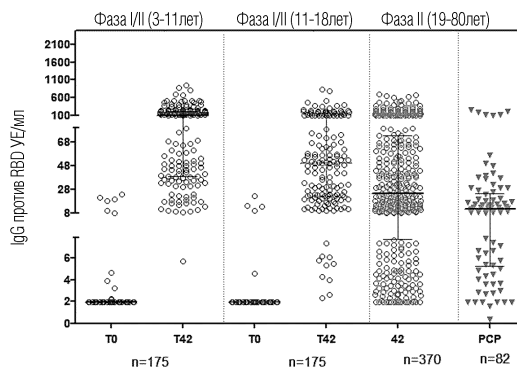
(72) Изобретатель:

Вальдес Балбин Юрий, Сантана
Медерос Дариэлис, Фернандес
Кастильо Сонсире, Гарсия Ривера
Дагмар, Гарсия Ривера Даниэль,
Гарсия Рикардо Мануэль, Родригес
Нода Лаура Марта, Рамирес Гонсалес
Убел Хесус, Санчес Рамирес Белинда,
Боджано Аё Тамми, Охито Магас
Эдуардо, Верес Бенкомо Висенте
Гильермо, Олива Эрнандес Рейналдо
(CU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Это изобретение относится к биотехнологии, более конкретно к области здоровья человека. В этом документе описаны, в частности, ковалентные конъюгаты рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 с белком-носителем, способ, используемый для их получения, и вакцинные композиции, которые их содержат. Вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются пригодными для профилактики инфекции SARS-CoV-2, поскольку они могут индуцировать сильный ответ нейтрализующих антител.



A1

202391068

202391068

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 578154EA/032

КОВАЛЕНТНЫЕ КОНЬЮГАТЫ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-COV-2 И БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к биотехнологии, более конкретно, к области здоровья человека. В этом документе описаны, в частности, ковалентные конъюгаты рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 с белком-носителем, способ, используемый для их получения, и вакцинные композиции, которые их содержат.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

COVID-19 является совсем недавно появившимся заболеванием, открытым в Ухани, Китай, в декабре 2019 года, когда начали появляться сообщения о серьезных случаях пневмонии неизвестной этиологии. Заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2, характеризуется его быстрым распространением и появлением симптомов, таких как лихорадка, кашель, ринорея, боль в горле и диспноэ, в случае имеющих симптомы пациентов, число которых составляет менее 50%. Остальные люди, которые инфицируются, являются бессимптомными, что является ключевым фактором распространения вируса и является эпидемиологической проблемой с точки зрения его контроля (Отчеты ВОЗ о ситуации с коронавирусом заболеванием (COVID-2019) на www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports. Данные от 13 августа 2020 года).

Другие коронавирусы, сходные с SARS-CoV-2, известные как MERS и SARS, уже вызывали сходные эпидемии в предшествующие десятилетия. SARS демонстрирует более высокую гомологию с SARS-CoV-2, и одним из основных сходств между ними является то, что оба вируса используют белок ACE2 в качестве рецептора для проникновения в клетки человека. Таким образом, как в SARS, так и в SARS-CoV-2, взаимодействие между рецептор-связывающим доменом (RBD) вирусного белка S1 и белком ACE2 (ангиотензин-конвертирующий фермент 2) является решающим фактором для людей, инфицированных вирусом. (Walls A et al (2020) Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>). RBD S-белка SARS-CoV-2 представляет собой фрагмент размером приблизительно 195 аминокислот (последовательность 333-257), который содержит рецептор-связывающий мотив (RBM) и представляет собой область, в которой вирус взаимодействует с рецептором ACE2. RBD содержит 4 внутримолекулярных дисульфидных мостика между остатками цистеина Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 и Cys480-Cys488, которые помогают сформировать очень компактную и стабильную структуру (Lan et al (2020), Nature Vol 581: 215-230).

RBD является небольшой молекулой, молекулярная масса которой находится в диапазоне от 25 до 27 кДа в зависимости от экспрессирующего хозяина и включенных углеводов, в основном связанных с остатками аспарагина N331 и N343 (Chen WH et al.,

2017, Journal of Pharmaceutical Sciences 106: 1961-1970).

Стратегии для вакцин против SARS-CoV-2 включают инактивированный вирус, генные конструкции, которые содержат вирусный генетический материал, включенный в аденовирусную или матричную РНК, и вакцины на основе вирусных белковых субъединиц или фрагментов, экспрессируемых в генно-модифицированных хозяевах. В этом случае, предпочтительной молекулой является S-белок, также известный как спайк-белок, или фрагмент его структуры, т.е. RBD. Основным преимуществом является их безопасность, поскольку эта стратегия является более близкой к стратегии многих используемых вакцин, тем не менее, ее основной проблемой является достижение иммунного ответа, который является достаточным для защиты от вирусной инфекции.

На настоящий момент (21 сентября 2020 года) существует 149 являющихся кандидатами вакцин против SARS-CoV-2, которые проходят доклиническую оценку, и 38 проходят клинические испытания. Из этих 38, по меньшей мере 13 вакцинных кандидатов (5 в клинических испытаниях и 8 в доклинических испытаниях) имеют RBD в качестве специфического антигена (черновой обзор являющихся кандидатами вакцин против COVID-19-21 сентября 2020 года).

Эти вакцины состоят из RBD, адсорбированного на оксиде алюминия, в высоких концентрациях вплоть до 50 микрограммов на дозу (Интернет на clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT04466085&draw=2&rank=1, согласно 17 августа 2020 года). В других вакцинных кандидатах используется белок RBD, содержащий аминокислотные остатки 319-545, экспрессированный в бакуловирусе и клетках насекомых, очищенный и составленный с использованием гидроксида алюминия в качестве адъюванта. (Yang J et al (2020) Nature Vol 586: 572-592). RBD в его мономерной форме также используют в экспериментах на животных в адсорбированной на оксиде алюминия форме, демонстрируя, что он может индуцировать нейтрализующие антитела без антителозависимого усиления (Zang J. et al (2020) bioRxiv 2020.05.21.107565).

Ни одно из вышеупомянутых технических решений не является близким настоящему изобретению. Авторы настоящего изобретения сфокусировались на структуре RBD, получив RBD, ковалентно конъюгированный с белками-носителями. Эти конъюгаты могут быть получены из любого фрагмента, содержащего последовательность 333-527 (SEQ ID NO. 2), или его удлинений.

Неожиданно, иммунный ответ, индуцируемый против этих конъюгатов, является более сильным, чем иммунный ответ, индуцируемый неконъюгированным мономером RBD, с точки зрения его кинетики и способности нейтрализовывать вирус, определенной в анализе нейтрализации вируса с использованием анализа ингибирования связывания SARS-CoV-2 и ACE2-рецептора. Они являются ключевыми характеристиками в условиях пандемического сценария, вызванного SARS-CoV-2. Вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, индуцируют ответ IgG-антител против RBD на 7 сутки после иммунизации с поляризацией клеточного ответа в сторону паттерна Th1, характеризующегося индукцией IFN γ ; таким образом, в этом случае не ожидаются

иммунопатологические эффекты, описанные для коронавирусных вакцин, которые индуцируют паттерн Th2.

Одной из слабых сторон приобретенного иммунитета после коронавируса является то, что он не длится долго. Вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, индуцируют ответ $CD8^+$, $CD4^+$ Т-клеток памяти, в частности, лимфоцитов, специфичных к RBD, которые продуцируют $IFN\gamma$.

Следует отметить, что ни в одном из технических решений или научных публикаций до настоящего изобретения не описаны ковалентные конъюгаты RBD с белком-носителем, полученные химическими способами, а также вакцинные композиции на основе таких конъюгатов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к ковалентным конъюгатам, содержащим рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2 и белок-носитель. Эти конъюгаты характеризуются, в частности, тем, что соотношение RBD и белка-носителя предпочтительно находится в молярном диапазоне 1-8 единиц RBD на один белок-носитель, хотя также можно получать конъюгаты с вплоть до 13 единиц RBD. Белок-носитель может быть выбран из группы, которая включает столбнячный токсин, дифтерийный токсин и мутант дифтерийного токсина CRM197. Иммунный эффект, достигаемый посредством конъюгации со столбнячным токсином, также может быть индуцирован посредством конъюгации с другими белками-носителями, так что эффект настоящего изобретения не ограничивается использованием столбнячного токсина.

Антиген RBD, используемый для конъюгации, может иметь одну из следующих аминокислотных последовательностей, а именно, 319-541 (SEQ ID NO:1), 333-527 (SEQ ID NO:2), 328-533 (SEQ ID NO:3). SEQ ID NO:1, в частности, также может встречаться в димерной форме. Антиген RBD может продуцироваться в хозяине, выбранном из группы, включающей: клетки млекопитающих (предпочтительно, не являющихся человеком), клетки насекомых, бактерий и дрожжей.

Другой вариант осуществления изобретения относится к вакцинным композициям для индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2 посредством ковалентных конъюгатов, состоящих из рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 и белка-носителя. Эти вакцинные композиции также могут включать адъювант, выбранный из группы, включающей любую минеральную соль, такую как гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция, среди прочих. Конъюгат указанных вакцинных композиций имеет RBD в диапазоне концентраций 1-30 мкг на дозу, в то время как адъювант присутствует в диапазоне концентраций 200-1500 мкг на дозу. Эти композиции также содержат подходящие фармацевтические эксципиенты.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу получения ковалентных конъюгатов, включающему следующие стадии: А) функционализация белка-носителя для внесения тиофильных групп; В) ковалентная конъюгация белка-носителя с

RBD, и С) очистка. Эта методика также может включать стадию, состоящую в восстановлении *in situ* димера RBD перед стадией А, на которой SEQ ID NO:1 присутствует в его димерной форме (фиг.1). Более того, способ может включать другую стадию тиолирования N-конца RBD перед стадией А, на которой используются SEQ ID NO:1-3 (фиг.2). Тиофильные группы, внесенные на стадии А способа, выбирают из группы, включающей малеинимиды, бромацетилы, винилсульфоны, акрилаты, акриламиды, акрилонитрилы и метакрилаты.

Другой вариант осуществления изобретения относится к применению вышеупомянутых вакцинных композиций для профилактики инфекции вирусом SARS-CoV-2. Оно вовлекает, в частности, применение вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, когда требуется ответ нейтрализующих антител.

Наконец, другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению вышеупомянутых вакцинных композиций для индукции раннего ответа IgG-антител против SARS-CoV-2 с использованием схемы внутримышечной иммунизации, охватывающей 1-3 введения в диапазоне от 1 до 30 мкг RBD.

Далее, в первом аспекте настоящее изобретение относится к ковалентному конъюгату, содержащему рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2 и белок-носитель.

В предпочтительном варианте осуществления ковалентного конъюгата по изобретению белок-носитель выбран из группы, включающей столбнячный токсин, дифтерийный токсин и мутант дифтерийного токсина CRM197 (фиг.3 и 4).

В предпочтительном варианте осуществления ковалентного конъюгата по изобретению молярное соотношение RBD и белка-носителя находится в диапазоне от 1 до 8 RBD на белок-носитель (фиг.5).

В предпочтительном варианте осуществления ковалентного конъюгата по изобретению RBD выбран из группы, включающей SEQ ID NO: 1, 2 и 3.

В предпочтительном варианте осуществления ковалентного конъюгата по изобретению RBD SEQ ID NO:1 используется в его димерной форме.

В предпочтительном варианте осуществления ковалентного конъюгата по изобретению RBD продуцируется в хозяине, выбранном из группы, содержащей или состоящей из клеток млекопитающего (предпочтительно, не являющегося человеком), клеток насекомого, бактерий и дрожжей.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вакцинной композиции, содержащей ковалентный конъюгат по изобретению, как описано выше. Вакцинную композицию предпочтительно используют для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинной композиции по изобретению, вакцинная композиция дополнительно включает адъювант, выбранный из группы, содержащей или состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия и фосфата кальция.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинной композиции по изобретению конъюгат присутствует в диапазоне концентраций RBD 1-30 мкг на дозу.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинной композиции по изобретению адъювант присутствует в диапазоне концентраций 200-1500 мкг на дозу.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинной композиции по изобретению вакцинная композиция дополнительно включает подходящие фармацевтические эксципиенты.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения ковалентного конъюгата по изобретению, как описано выше, причем способ включает стадии: предоставления белка-носителя и RBD, где RBD может присутствовать в мономерной или в димерной форме, функционализации белка-носителя путем внесения тиофильных групп, осуществляющих ковалентную конъюгацию белка-носителя с RBD, и очистку полученного конъюгата.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения ковалентного конъюгата по изобретению, где используется димер RBD, способ включает дополнительную стадию восстановления димера RBD, предпочтительно *in situ*, перед его конъюгацией с белком-носителем, предпочтительно перед функционализацией белка-носителя путем внесения тиофильных групп.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения ковалентного конъюгата по изобретению можно использовать RBD любой из SEQ ID NO:1-3, наиболее предпочтительно, в качестве RBD используется SEQ ID NO:1.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения ковалентного конъюгата по изобретению, вносимые тиофильные группы выбирают из группы, содержащей или состоящей из малеинимида, бромацетила, винилсульфона, акрилата, акриламида, акрилонитрила и метакрилата.

В другом аспекте настоящее изобретение относится конъюгату, полученному способом получения ковалентного конъюгата по изобретению, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению вакцинной композиции по изобретению для профилактики инфекции вирусом SARS-CoV-2, в частности, для профилактики заболевания, вызываемого инфекцией вирусом SARS-CoV-2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики заболевания, вызываемого инфекцией вирусом SARS-CoV-2, включающему введение индивидууму терапевтически эффективной дозы вакциной композиция по изобретению, как описано выше.

Предпочтительно, в применении для профилактики инфекции или способе профилактики заболевания согласно изобретению применение или способ предназначены для профилактики инфекции вирусом SARS-CoV-2 или заболевания в результате нее у индивидуумов, нуждающихся в ответе нейтрализующих антител после проведения введения двух доз или двух вакцинаций вакцинными композициями.

В предпочтительных вариантах осуществления применения и способа профилактики инфекции или заболевания согласно изобретению применение или способ предназначены для индукции антительного ответа SARS-CoV-2 с использованием схемы внутримышечной вакцинации из 1-3 доз. Предпочтительно в дозе вакцинации по схеме согласно настоящему изобретению количество RBD находится в диапазоне от 1 до 30 мкг.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1. Схема сайт-селективной конъюгации рецептор-связывающего домена SARS-Cov-2 (RBD) со столбнячным токсидом (ТТ), активированным тиофильными малеинимидными группами. Конъюгация проводится по свободному тиолу Cys538, который пространственно отдален от рецептор-связывающего мотива (указанного красным), и, таким образом, она не влияет на антигенность RBD.

Фигура 2. Схема N-концевой селективной конъюгации рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-Cov-2 со столбнячным токсидом (ТТ), активированным тиофильными малеинимидными группами. N-концевое тиолирование RBD проводится с новыми (самостоятельно разработанными) тиацетил-пиридинокарбальдегидными реагентами, которые модифицируют селективность N-концевой аминокислоты. N-концевой остаток пространственно отдален от рецептор-связывающего мотива (указанного красным), и, таким образом, он не влияет на антигенность RBD.

Фиг.3. Рисунок конъюгата RBD на основе RBD (319-541), конъюгированного с Cys538, с использованием А) столбнячного токсоида, В) дифтерийного токсоида или С) перекрестно-реактивного материала 197 (CRM197) в качестве белка-носителя.

Фиг.4. Рисунок конъюгата RBD на основе RBD (328-533), конъюгированного на N-конце, с использованием А) столбнячного токсоида, В) дифтерийного токсоида или С) перекрестно-реактивного материала 197 (CRM197) в качестве белка-носителя.

Фиг.5. Изображение конъюгатов RBD-ТТ, имеющих в среднем 2, 4 и 6 единиц RBD на единицу столбнячного токсоида. Также были получены конъюгаты, имевшие в среднем 8, 10 или 13 единиц RBD.

Фиг.6. Хроматограммы HPSEC Superdex 75, демонстрирующие восстановление димера RBD (SEQ ID NO:1) до мономера RBD, и сравненные с референсным профилем мономера RBD.

Фиг.7. 10% SDS-PAGE нативной формы RBD и RBD, полученного путем восстановления димера RBD (SEQ ID NO:1). R: образец инкубировали в буфере для восстановления образца перед нанесением на гель. NR: Образец наносили в невосстанавливающем буфере для образца.

Фиг.8. Антигенность мономера, полученного путем восстановления димера RBD (SEQ ID NO:1) трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР), по сравнению с антигенностью нативного мономера и димера.

Фиг.9. Хроматограммы HPSEC Superdex 200 для очищенных конъюгатов RBD-ТТ 2 и 3 (Пример 2), по сравнению с хроматограммой столбнячного токсоида.

Фиг.10. Распознавание конъюгата RBD(319-541)-ТТ рецептором ACE-2,

проанализированное посредством ELISA (**A**) и посредством дот-блоттинга с использованием поликлональных антител против RBD (**B**).

Фиг.11. Кинетика IgG-антител против RBD, индуцированных после вакцинации на 0 и 14 сутки конъюгатом RBD-ТТ, составленным или не составленным в $Al(OH)_3$, по сравнению с RBD, составленным в $Al(OH)_3$. Звездочками указаны значимые отличия ($p \leq 0,05$) между группами в каждый момент времени.

Фигура 12. Кинетика IgG-антител против ТТ, индуцированных после вакцинации на 0 и 14 сутки конъюгатом RBD-ТТ, составленным или не составленным в $Al(OH)_3$.

Фиг.13. Ингибирование связывания RBD-ACE2, определенное в ELISA с разведениями антител, индуцированных на 28 сутки у мышей, иммунизированных на 0 и 14 сутки вакцинными композициями конъюгата RBD-ТТ, составленного или не составленного в $Al(OH)_3$, по сравнению с RBD, составленным в $Al(OH)_3$.

Фиг.14. Нейтрализующая активность SARS-CoV-2 на 28 сутки в сыворотках мышей, иммунизированных двумя дозами конъюгата RBD-ТТ, составленного или не составленного в $Al(OH)_3$, по сравнению с RBD, составленным в $Al(OH)_3$. Звездочками указаны значимые отличия ($p < 0,05$).

Фиг.15. Продуцирование $IFN\gamma$, IL4 и IL17A в клетках селезенки мышей, иммунизированных RBD-ТТ, составленным в $Al(OH)_3$, или плацебо ($Al(OH)_3$), при определении посредством количественного ELISA. Звездочками указаны значимые отличия ($p < 0,05$) в соответствии с критерием Тьюки.

Фиг.16. Ответ клеток памяти, индуцированный у мышей, иммунизированных двумя дозами конъюгата RBD-ТТ, составленного в $Al(OH)_3$. (**A**) $CD8^+ CD44^{++}$ Т-лимфоциты, (**B**) $IFN\gamma$ -продуцирующие- $CD8$ Т-лимфоциты, (**C**) $CD4^+ CD44^{++}$ Т-лимфоциты памяти и (**D**) $IFN\gamma$ -продуцирующие $CD4$ Т-лимфоциты. RBD/RBD: группа, в которой вводили две дозы (T0, T14) RBD-ТТ и выделенные лимфоциты стимулировали *in vitro* посредством RBD. Квасцы/RBD: группа, в которой вводили две дозы (T0, T14) квасцов и выделенные лимфоциты стимулировали *in vitro* посредством RBD.

Фиг.17. Хроматограммы HPSEC Superdex 75, демонстрирующие селективное тиолирование N-концевого остатка мономера RBD (SEQ ID NO:3) по сравнению с референсным профилем мономера RBD.

Фиг.18. (**A**) Хроматограммы HPSEC Superdex 75, демонстрирующие конъюгат мономера RBD (SEQ ID NO:3), тиолированного на N-концевом остатке (верхняя панель), 16-ч реакционную смесь RBD-ТТ 4 (центральная панель) и очищенный конъюгат RBD-ТТ 4 (нижняя панель). (**B**) Хроматограммы HPSEC Superdex 200 очищенного конъюгата RBD-ТТ 4 по сравнению со столбнячным токсидом.

Фиг.19. Распознавание конъюгата RBD (328-533)-ТТ рецептором ACE-2, проанализированное посредством (**A**) теста ELISA и (**B**) дот-блоттинга с поликлональными антителами против RBD.

Фиг.20. IgG-антитела против RBD, индуцированные через 14 суток (T42) после иммунизации на 0 и 28 сутки конъюгатной вакциной в клиническом испытании фазы II

(19-80 лет) и клиническом испытании фазы I/II (3-18 лет). PCP: панель сывороток от педиатрических реконвалесцентов.

Фиг.21. IgG против RBD в образцах слюны вакцинированных или невакцинированных индивидуумов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин "SARS-CoV-2", в рамках изобретения, относится к коронавирусу 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) (SARS-CoV-2), этиологическому фактору коронавирусного заболевания 2019 (COVID-19). Тестирование положительных случаев SARS-CoV-2 может быть основано на детекции последовательностей вирусной РНК посредством NAAT, такого как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (rRT-PCR), с подтверждением при необходимости посредством секвенирования нуклеиновых кислот. Вирусные гены, которые до настоящего времени являлись мишенями, включает гены N, E, S и RdRP. Термины "заболевание SARS-CoV-2" и "COVID", используются в настоящем описании взаимозаменяемо, и относятся к вирусному инфекционному заболеванию, вызываемому коронавирусом 2 острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2). Основные симптомы COVID-19 включают лихорадку, кашель и одышку. Реже встречается мышечная боль, продуцирование мокроты и боль в горле. В то время как большинство случаев приводят к мягким симптомам, некоторые прогрессируют до тяжелой пневмонии и полиорганной недостаточности. Инфекция, как правило, передается от одного индивидуума к другому через респираторные капли, образующиеся при кашле. Она также может распространяться путем прикосновения к зараженным поверхностям с последующим прикосновением к лицу.

Термин "рецептор-связывающий домен (RBD)", в рамках изобретения, относится к рецептор-связывающему домену (RBD) спайк(S)-белка коронавируса, и он включает указание на часть спайк(S)-белка коронавируса, которая вовлечена в прикрепление вируса к рецептору на клетке индивидуума и последующее вхождение в клетку. Клеточный рецептор может представлять собой рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2). Предпочтительно, RBD содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1-3. Также определение RBD предусматривает RBD, который является антигенной частью аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1-3. RBD, как описано в настоящем описании, может быть модифицирован так, чтобы 1-100, предпочтительно 1-50, более предпочтительно 1-10 аминокислотных остатков были добавлены, заменены или удалены в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1-3 или ее антигенной части, предпочтительно где указанный модифицированный RBD связывается с продуктом иммунного ответа, предпочтительно антителом, которое индуцируется, когда индивидуума иммунизируют конъюгатом, как описано в настоящем описании, где RBD указанного конъюгата содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1-3. Термин RBD, таким образом, включает последовательность, обладающую 80%, предпочтительно 90%, более предпочтительно

95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:1-3 и связывающую продукт иммунного ответа, предпочтительно антитело, которое индуцируется когда индивидуума иммунизируют конъюгатом, как описано в настоящем описании, где RBD указанного конъюгата содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1-3.

В некоторых аспектах настоящего изобретения термин "рецептор-связывающий домен (RBD) спайк(S)-белка коронавируса" относится только к RBD-части полного спайк(S)-белка коронавируса.

Термин "спайк(S)-белок", или эквивалентный термин "спайк(S)-гликопротеин", относится к S-белку коронавируса, состоящему из S1-субъединицы (N-концевая головка) и S2-субъединицы (С-концевой стебель). S1-субъединица опосредует прикрепление и вход вируса через ее N-концевой домен S1A (содержащий сиаловые кислоты, фактор прикрепления вируса), и ее С-концевой рецептор-связывающий домен (RBD), который связывается с рецептором ACE2 для SARS. Субъединица S2 является более консервативной и опосредует слияние вируса с клеткой-хозяином через пептид слияния (FP) и два гептадных повтора HR1 и HR2. Связывание RBD S-белка SARS-CoV с рецепторами ACE2 и CLEC4M/DC-SIGNR человека приводит к интернализации вируса в эндосомы клетки-хозяина.

Термин "белок-носитель", в рамках изобретения, относится к иммуногенному белку, с которым может связываться антиген, такой как белок, олигосахарид или полисахарид. В результате связывания с носителем связанная молекула может стать более иммуногенной. Ковалентное связывание молекулы с носителем обеспечивает усиленную иммуногенность и зависимость от Т-клеток.

В рамках изобретения, термин "белок" используют в настоящем описании для обозначения серии аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-аминогруппой и карбоксигруппой соседних остатков, также известной как "полипептид". Термины "белок" и "полипептид" относятся к полимеру аминокислот, включающему модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные и т.д.) и аминокислотные аналоги, независимо от его размера или функции. "Белок" и "полипептид" часто используют применительно к относительно крупным полипептидам, в то время как термин "пептид" часто используют применительно к небольшим полипептидам, однако использование этих терминов в данной области перекрывается. В контексте настоящего изобретения термины "белок", "полипептид" и "пептид" используются полностью взаимозаменяемо.

Следует понимать, что белки, включая антигены (RBD) по изобретению, могут отличаться от точных последовательностей, проиллюстрированных и описанных в настоящем описании. Таким образом, изобретение охватывает делеции, вставки и замены в представленных последовательностях при условии, что последовательности функционируют в соответствии со способами по изобретению. В этом отношении, особенно предпочтительные замены обычно являются консервативными по своей

природе, т.е. являются заменами, которые происходят в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно подразделяют на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Является обоснованным предположение, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином, или наоборот; аспартата глутаматом, или наоборот; треонина серином, или наоборот; или сходная консервативная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет иметь значительного эффекта на биологическую активность. Белки, имеющие по существу ту же аминокислотную последовательность, что и описанные и проиллюстрированные последовательности, но обладающие незначительными аминокислотными заменами, не обладают существенно измененной иммуногенностью и, таким образом, входят в объем изобретения. Идентичность последовательностей на протяжении всей длины белка RBD, составляющая по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, считается функциональным вариантом белка RBD SEQ ID NO:1-3 и может использоваться в некоторых аспектах настоящего изобретения. Термин "% идентичность последовательностей" определяют в настоящем описании как процент нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, или аминокислот в аминокислотной последовательности, которые являются идентичными с нуклеотидами, и, соответственно, аминокислотами, в представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности после выравнивания последовательностей и необязательно внесения пропусков, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области. Идентичность последовательностей вычисляют на протяжении по существу всей длины, предпочтительно на протяжении всей (полной) длины представляющей интерес аминокислотной последовательности. Специалисту в данной области понятно, что последовательные аминокислотные остатки в одной аминокислотной последовательности сравнивают с последовательными аминокислотными остатками в другой аминокислотной последовательности.

Термин "столбнячный токсид", в рамках изобретения, относится к хорошо известному пептиду столбнячного токсина, который соответствуют эпитопу в остатках 830-844 столбнячного токсина. Было показано, что эта последовательность связывает множество аллелей HLA-DR, и она описывается как универсально иммуногенная. Аминокислотная последовательность представляет собой QYIKANSKFIGITEL.

Термин "дифтерийный токсид", в рамках изобретения, относится к инактивированному экзотоксину, секретируемому *Corynebacterium diphtheriae* - единой полипептидной цепи из 535 аминокислот, состоящей из двух субъединиц, соединенных

дисульфидными мостиками. Дифтерийный токсин получают во всем мире стандартным образом; в США методики получения и тестирования указаны в своде федеральных предписаний.

Термин "мутант дифтерийного токсина CRM197", в рамках изобретения, относится к нетоксичному мутанту дифтерийного токсина, часто используемому в качестве белка-носителя для полисахаридов и гаптенных, чтобы они стали иммуногенными. Единичная замена G->A в последовательности дифтерийного токсина дикого типа приводит к замене глицина-52 на глутаминовую кислоту (Giannini et al. 1984 *Nucleic Acids Res.* 12(10): 4063-4069).

Термин "ковалентный", в рамках изобретения, относится к химической связи, в которой два атома обладают одной или несколькими общими парами электронов, которые удерживают их вместе.

Термин "ковалентная конъюгация", в рамках изобретения, относится к стадии получения конъюгата посредством химических реакций.

Термин "вакцина", в рамках изобретения, относится к композиции антигенных частей, обычно состоящей из модифицированных живых (аттенуированных) или инактивированных инфекционных агентов, или некоторой части инфекционных агентов, которую вводят, наиболее часто с адъювантом, в организм для индукции активного иммунитета. Настоящее изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим конъюгат, как описано выше, в фармацевтически приемлемом носителе. Такой носитель может представлять собой водную жидкую или аэрозольную композицию.

Термин "доза", в рамках изобретения, относится к количеству или отмеренной величине конъюгата или композиции по изобретению, которые вводят или рекомендованы для введения в конкретный момент времени.

Термин "адъювант", в рамках изобретения, относится к соединению или соединениям, которые при использовании в комбинации с конкретными вакцинными антигенами в составах усиливают или иным образом изменяют или модифицируют конечный иммунный ответ. Предпочтительно, адъювант представляет собой квасцы (соль алюминия), такие как гидроксид алюминия.

Термин "фармацевтический эксципиент", в рамках изобретения, относится к материалу, такому как адъювант, носитель, pH-корректирующее и буферное вещество, корректирующее тоничность вещество, смачивающее вещество, консервант и т.п. Вакцинные эксципиенты описаны, например, в актах правительственного регулирования, таких как европейская фармакопея и американский 9 CFR, и в справочниках, таких как: *The Handbook of Pharmaceutical Excipients* (R. Rowe et al., Pharmaceutical press 2012, ISBN 08571 10276); *Remington: the science and practice of pharmacy* (2000, Lippincott, USA, ISBN: 683306472).

Термин "восстановление in situ", в рамках изобретения, относится к конвертированию димера в мономер RBD, как описано в настоящем описании. Восстановление димеров предпочтительно проводят с использованием трис(2-

карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР). Предпочтительно, восстановление проводят *in situ*, что означает что димер смешивают с ТСЕР, а затем с белком-носителем без какой-либо промежуточной стадии очистки.

Термин "тиолирование", в рамках изобретения, относится к внесению сульфгидрильной (SH) группы на N-конец RBD или N-концевой остаток. Тиолирования можно достигать посредством реакции RBD с избытком 2-тиоацетилпиридин-2-карбоксальдегида с последующей обработкой гидроксиламином.

Термин "функционализация", в рамках изобретения, относится к внесению одной или нескольких тиофильных групп в белок-носитель. Тиофильные группы могут включать малеинимиды, бромацетилы, винилсульфоны, акрилаты, акриламиды, акрилонитрилы и метакрилаты. Специалист в данной области хорошо знаком со способами внесения одной или нескольких тиофильных групп в белок. Функционализация может быть достигнута, например, посредством реакции белка-носителя с N-гидроксисукцинимидным эфиром малеимида-пропионовой кислоты в соответствующем буфере.

В некоторых аспектах настоящего изобретения тиолированному RBD затем позволяют реагировать с тиофильной группой(ами) функционализированного белка-носителя с получением конъюгата по изобретению. В зависимости от стехиометрии реакции, полученные конъюгаты содержат от одной до восьми единиц RBD на единицу белка-носителя. Методика конъюгации, описанная в настоящем описании, является хемоселективной и специфичной к остаткам. Ковалентный конъюгат в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно не является слитым белком, где RBD и белок-носитель соединены через пептидную связь.

В рамках изобретения, термин "введение," относится к локализации соединения или композиции, как описано в настоящем описании, в индивидууме посредством способа или пути, который приводит по меньшей мере к частичной доставке конъюгата в желаемую область. Фармацевтические композиции, содержащие соединения, описанные в настоящем описании, можно вводить любым подходящим путем, который приводит к эффективному лечению индивидуума. Предпочтительно, введение проводят путем инъекции, предпочтительно внутримышечной.

В рамках изобретения, "индивидуум" означает человека или не являющегося человеком животного. Обычно не являющееся человеком животное является позвоночным, таким как примат, грызун, домашнее животное или промысловое животное. Приматы включают шимпанзе, яванских макаков, паукообразных обезьян и макаков, например, резус. Грызуны включают мышей, крыс, сурков, хорьков, кроликов и хомячков. Также животные включают броненосцев, ежей и верблюдов, среди многих других. Домашние и промысловые животные включают коров, лошадей, свиней, оленей, бизонов, буйволов, виды кошачьих, например, домашнюю кошку, виды собачьих, например, собаку, лису, волка, виды птиц, например, курицу, эму, страуса, и рыб, например, форель, зубатку и лосось. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является млекопитающее, например, примат, например, человек. Термины, "индивидуум,"

"пациент" и "субъект" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Предпочтительно, индивидуумом является млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой человека, не являющегося человеком примата, мышь, крысу, собаку, кошку, лошадь, корову или свинью, но не ограничиваясь этими примерами. В качестве индивидуумов преимущественно можно использовать млекопитающих, которые являются моделями на животных для данного состояния. Предпочтительно индивидуумом является человек. Индивидуум может быть мужского или женского пола. Индивидуумом может быть индивидуум, у которого ранее диагностировано или идентифицировано, что он страдает или имеет состоянием, нуждающимся в лечении, и необязательно уже подвергался лечению. Альтернативно индивидуумом также может быть индивидуум, у которого ранее не было диагностировано наличие состояния. Например, индивидуумом может быть индивидуум, который имеет один или несколько факторов риска, или индивидуум, который не имеет факторов риска.

"Индивидуум, нуждающийся" в лечении конкретного состояния, может представлять собой индивидуума, имеющего это состояние, диагностированного как имеющий это состояние или имеющего риск развития этого состояния.

Термин "профилактика инфекции вирусом SARS-CoV-2", в рамках изобретения, и термин "предупреждение заболевания, вызываемого инфекцией вирусом SARS-CoV-2", в рамках изобретения, относятся к предупреждению или лечению заболевания COVID-19 или заболевания, вызываемого вирусом SARS-CoV-2 или его вариантом.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение", "проведение лечения" или "смягчение" относятся к терапевтическому лечению, где задачей является обращение вспять, смягчение, облегчение, ингибирование, замедление или остановка прогрессирования или тяжести состояния, ассоциированного с заболеванием или нарушением, например злокачественной опухоли или воспаления. Термин "лечение" включает снижение или облегчение по меньшей мере одного неблагоприятного эффекта или симптома состояния, заболевания или нарушения. Лечение, как правило, является "эффективным", если один или несколько симптомов или клинических маркеров уменьшаются. Альтернативно лечение является "эффективным", если прогрессирование заболевания снижается или останавливается. Таким образом, "лечение" включает не только улучшение симптомов или маркеров, но также остановку или по меньшей мере замедление прогрессирования или ухудшения симптомов по сравнению с тем, что ожидалось бы в отсутствие лечения. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение одного или нескольких симптома(ов), уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. без ухудшения) состояние заболевания, отсрочивание или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение болезненного состояния, ремиссию (как частичную, так и полную) и/или снижение смертности, как поддающиеся определению, так и не поддающиеся определению. Термин "лечение" заболевания также включает обеспечение облегчения симптомов или побочных эффектов заболевания (включая паллиативное

лечение).

Термин "эффективное количество", в рамках изобретения, относится к количеству вакцинного антигена, необходимому для облегчения по меньшей мере одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, и относится к достаточному количеству фармакологической композиции для обеспечения желаемого эффекта. Таким образом, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству вакцинного антигена, которое является достаточным для достижения конкретного эффекта при введении типичному индивидууму. Эффективное количество, в рамках изобретения в различных контекстах, также включает количество, достаточное для отсрочивания развития симптома заболевания, изменения течения симптома заболевания (например, но не ограничиваясь ими, замедление прогрессирования симптома заболевания или его тяжести) или устранения симптома заболевания. Таким образом, обычно не практикуется указание точного "эффективного количества". Однако для данного случая подходящее "эффективное количество" может быть определено специалистом в данной области с использованием только рутинного экспериментирования. Эффективное количество предпочтительно вызывает ответ нейтрализующих антител у индивидуума.

Термин "терапевтически эффективное количество", в рамках изобретения, относится к количеству терапевтического средства для лечения, облегчения, противодействия, ингибирования или профилактики желаемого нарушения или состояния, или для демонстрации поддающегося детекции терапевтического или профилактического эффекта. Точное эффективное количество, требующееся индивидууму, зависит от размера и состояния здоровья индивидуума, природы и степени состояния и терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранной для введения. Терапевтически эффективное количество для данной ситуации может быть определено посредством рутинного экспериментирования.

Термин "ответ нейтрализующих антител" относится к образованию антител у индивидуума, которые связываются и снижают или уменьшают активность чужеродного белка, например RBD SARS-CoV-2. Активность чужеродного белка может быть снижена на поддающуюся определению величину, например, на 10%, 25%, 50%, 75% или 100% (т.е. полная инактивация), например, по сравнению с активностью чужеродного белка в отсутствие или перед индукцией ответа нейтрализующих антител. Активность чужеродного белка может быть определена любым способом, известным в данной области.

Термин "вакцинация", в рамках изобретения, относится к введению вакцины для индукции ответа нейтрализующих антител иммунной системой реципиента для развития защиты от заболевания.

Термин "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем описании для указания на те соединения, материалы, композиции и/или дозированные формы, которые по мнению медицинского специалиста являются пригодными для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического

ответа или другой проблемы или осложнения, в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Способ получения антигена RBD

Кодирующие последовательности белка RBD синтезируют и субклонируют в соответствующий экспрессирующий вектор, предпочтительно pcDNA3.1. Выбранные аминокислотные последовательности RBD представляют собой SEQ ID NO:1-3 или их удлинения. Конструкции, содержащие белки-мишени, можно экспрессировать в одном из хозяев, традиционно используемых в биотехнологии, а именно, в клетках млекопитающих (CHO, HEK293), клетках насекомых, бактериях и дрожжах, предпочтительно в клетках CHO.

Экспрессированный белок-мишень собирают посредством центрифугирования и фильтрации; его очищают на аффинной колонке, предпочтительно на колонке с Ni-сефарозой, а затем проводят очистку посредством эксклюзионной хроматографии, предпочтительно, в Superdex 200. Очищенный белок анализируют с использованием подходящих способов, таких как SDS-PAGE, HPSEC и MS, для определения молекулярного размера, чистоты, идентичности и аминокислотной последовательности, помимо других молекулярных характеристик.

Для получения ковалентных конъюгатов с белками-носителями авторы изобретения используют структуру RBD, которая представляет собой глобулярный белок, содержащий 195 аминокислот (последовательность Thr333-Pro527, SEQ ID NO:2). Указанная последовательность содержит четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика между остатками цистеина (Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 и Cys480-Cys488), создающих очень компактную и стабильную структуру. Эта последовательность образует биологически значимую структуру для применения для конъюгации RBD, поскольку она содержит четыре иммунодоминантных эпитопа, описанных для этой молекулы, а также рецептор-связывающий мотив. Эти конъюгаты могут быть получены из любого фрагмента, содержащего последовательность 333-527 или ее удлинения.

Более того, генетическая конструкция, используемая для продуцирования RBD, может включать удлинение на одном или обоих из концов последовательности 333-527, либо на N-конце в любой из аминокислот 333-300, либо на C-конце в области аминокислот 527-560. Является возможной активация одного из концов без влияния на биологически значимую структуру посредством самой генетической конструкции, в частности, путем удлинения последовательности для включения одной из природных аминокислот, которые считаются активными, например, цистеина 538. Другое решение состоит во внесении активных функциональных групп на один из концов; примером этого является функционализация тиольной группы N-концевой аминокислоты, в одном примере аргинина 328 последовательности 328-533 RBD (SEQ ID NO:3).

Аминокислотная последовательность белка-мишени из SEQ ID NO:1 содержит 9 остатков цистеина, включая 8, вовлеченных в 4 внутримолекулярных дисульфидных

мостика (Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 и Cys480-Cys488), которые приводит к очень компактной и стабильной структуре. В ходе очистки RBD и в присутствии воздуха (условия мягкого окисления), RBD SEQ ID NO:1 может димеризоваться путем образования дисульфидного мостика между двумя свободными остатками цистеина в положении 538 двух молекул RBD. Между тем, если RBD держат в атмосфере инертного газа (т.е. азот или аргон), цистеин 538 не вступает в реакцию, RBD остается в его мономерной форме и, таким образом, он может быть вовлечен в химические реакции с тиофильными группами.

Способ получения ковалентных конъюгатов RBD с белком-носителем

Белок-носитель может быть выбран из группы, включающей столбнячный токсин, дифтерийный токсин и мутант дифтерийного токсина CRM197 или любой другой белок, который выполняет ту же функцию в вакцинах для применения у человека. Способы получения и охарактеризации этих белков-носителя могут быть найдены в доступной литературе.

Способ конъюгации, описанный для настоящего изобретения, является хемоселективным и специфичным к остаткам. Указанный способ имеет три стадии. Первая стадия (A) состоит в функционализации белка-носителя для внесения тиофильных групп, предпочтительно малеинимидов, хотя можно использовать любые из известных тиофильных групп, а именно, бромацетилы, винилсульфоны, акрилаты, акриламиды, акрилонитрилы и метакрилаты. Функционализации можно достигать с использованием N-гидроксисукцинимидного эфира малеимида-пропионовой кислоты в диметилсульфоксиде (DMSO) при молярном соотношении к белку 100-200 в подходящем буфере. Функционализированный белок очищают посредством диафильтрации с использованием мембран с величиной MWCO, которая подходит для белка, подлежащего очистке, и степень функционализации определяют с использованием модифицированной методики Элмана.

Стадия (B) охватывает ковалентную конъюгацию RBD с функционализированным белком-носителем, который добавляют в реакционную смесь в соотношении по массе RBD:белок-носитель 0,2-9,4 (масс.:масс.) в подходящем буфере; смесь осторожно перемешивают в течение 4-18 ч при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ в атмосфере инертного газа. Оставшиеся тиофильные группы блокируют путем добавления правильной части цистамина.

Стадия (C) состоит в очистке полученных конъюгатов, которая может быть достигнута посредством диафильтрации с использованием мембраны с величиной MWCO, которая подходит для белка-носителя.

Конъюгацию можно проводить с использованием RBD SEQ ID NO:1, как в его мономерной, так и в димерной форме. Перед стадией (A) проводят другую стадию, которая включает восстановление межмолекулярного дисульфидного мостика в димере RBD, проведенное в мягких восстанавливающих условиях с использованием восстановителя дисульфидных связей, предпочтительно дитиотреитола (DDT) или трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP), в концентрациях в диапазоне 125 мкМ - 420 мкМ в

течение 5-20 минут и при температуре в диапазоне от 0 до 23°C. Эти условия селективно разрушают этот мостик, в частности, без влияния на другие четыре межмолекулярных дисульфидных мостика, упомянутых выше. Восстановление димера в мономер можно подтверждать посредством HPSEC, в то время сохранение четырех внутримолекулярных дисульфидных мостиков и антигенность соответственно проверяют посредством SDS-PAGE и непрямого теста ELISA.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения включает другую стадию тиолирования N-концевого остатка RBD перед стадией А. Эта методика охватывает реакцию с избытком 2-тиоацетилпиридин-2-карбоксальдегида (20-50 эквивалентов относительно RBD) в течение 12-48 часов при 23-37°C с последующими промываниями и обработкой избытком гидроксиламина при температуре окружающей среды в течение 1-5 часов.

В зависимости от стехиометрии реакции, полученные конъюгаты содержат от одной до восьми единиц RBD на единицу белка-носителя.

Вакцинные композиции и пути введения

Вакцины против SARS-CoV-2 на основе ковалентных конъюгатов рецептор-связывающего домена с белком-носителем вводят внутримышечным или подкожным путем в дозах RBD в диапазоне от 1 до 30 мкг, предпочтительно от 5 до 25 мкг. Эти вакцинные композиции могут содержать любую минеральную соль в качестве адъюванта, включая, но не ограничиваясь ими, гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция, в дозах в диапазоне от 200 до 1500 мкг, предпочтительно от 500 до 1000 мкг. Вакцинные композиции включают подходящие фармацевтические эксципиенты, которые могут регулировать pH, такие как фосфатные буферы в концентрациях в диапазоне от 3,0 до 7,0 мМ, обеспечивающие изотоничность растворы, такие как хлорид натрия в концентрациях в диапазоне от 50 до 150 мМ, и консерванты, такие как тиомерсал, фенол, 2-феноксэтанол, метилпарагидроксибензоат, формальдегид, м-крезол или другие метил- и пропилпарабены, предпочтительно тиомерсал.

Эти составы вакцинной композиции предпочтительно вводят по схеме с 1-3 дозами, предпочтительно каждые 7-28 суток, более предпочтительно каждые 14-28 суток, более предпочтительно каждые 21-28 суток. Предпочтительно, между последовательными дозами существует интервал по меньшей мере от одной до трех недель, предпочтительно интервал по меньшей мере две недели. Единичная доза для введения предпочтительно содержит количество RBD от 1 до 30 мкг. Контейнер, такой как флакон для инъекций, может содержать множество доз для вакцинации множества индивидуумов. Каждая доза предпочтительно составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 1 мл, предпочтительно каждая доза составляет приблизительно 0,3-0,5 мл, наиболее предпочтительно приблизительно 0,3 мл. Дозировки могут находиться в контейнере в концентрированной или лиофилизированной форме, и они могут быть разбавлены или восстановлены подходящей жидкостью для инъекций перед введением.

Предпочтительно введение является внутримышечным. Предпочтительно введение

не является внутрисосудистым, подкожным или внутрикожным. Вакцинные композиции, предложенные в рамках настоящего изобретения, демонстрируют их превосходство по сравнению с вакцинной композицией, содержащей неконъюгированный RBD с адьювантом; существует несколько характеристик этих вакцинных композиций, которые являются ключевыми в текущих обстоятельствах пандемии, а именно, быстрота индукции ответа и высокие уровни титров антител, которые выступают в качестве нейтрализаторов вируса SARS-CoV-2 и блокаторов взаимодействия RBD-рецептор ACE2. Эти композиции индуцируют иммунный ответ с паттерном Th1, а также ответ CD8⁺, CD4⁺ Т-клеток памяти и Т-клеток, специфичных к RBD, в частности Т-клеток, продуцирующих IFN γ .

Другие преимущества

Вакцинные композиции, предлагаемые в рамках настоящего изобретения, демонстрируют превосходные результаты в клинических испытаниях в педиатрической популяции.

Более того, вакцинные композиции, предлагаемые в рамках настоящего изобретения, демонстрируют ответ мукозальных IgG у вакцинированных людей. Важность этого состоит в том, что такой индуцированный мукозальный ответ снижает передачу вируса, а также инфекционность. Автор настоящего изобретения считает это уникальным новым свойством среди доступных в настоящее время вакцин против Covid-19.

Предполагается, что настоящая предлагаемая частичная структура RBD вместо вакцины на основе полного спайк-белка имеет важные преимущества, поскольку вакцина на основе полного спайк-белка демонстрирует важное неблагоприятное явление, такое как миокардит и перикардит. Эти побочные эффекты связаны с карбоксильной областью спайк-белка. Эта область не присутствует в предлагаемых в рамках настоящего изобретения конъюгатных вакцинах RBD-белок-носитель. Следует отметить, что предлагаемая в рамках настоящего изобретения вакцинная композиция является в высокой степени подходящей для педиатрического применения, поскольку упоминаемые побочные эффекты вакцин на основе полного спайк-белка являются особенно выраженными в педиатрической популяции.

Первоначальные результаты показывают, что иммунный ответ у индивидуумов со сниженным иммунитетом и нарушенным иммунитетом является в высокой степени благоприятным и лучшим, чем в случае других вакцин.

Авторы настоящего изобретения не идентифицировали других неблагоприятных явлений, сообщенных для вакцин на основе инаktivированного вируса вакцин или вакцин на основе аденовирусного вектора, и результаты оценки иммунного ответа или ответа нейтрализующих антител являются более высокими, чем в случае вакцин на основе инаktivированного вируса.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение мономера RBD (319-541) из RBD, димеризованного на Cys 538.

Димер RBD (319-541) растворяли в буфере PBS (35 mM, pH 7,4) с 0,5 mM EDTA до конечной концентрации белка 5-10 мг/мл. Добавляли TCEP до конечной концентрации от 125 мкМ до 420 мкМ. Реакционную смесь держали в течение десяти минут в атмосфере аргона при умеренном перемешивании при температуре окружающей среды.

Конвертирование в мономерную форму и ее молекулярную целостность подтверждали, соответственно, посредством HPSEC и полиакриламидного гелевого электрофореза. На фиг.6 представлены профили HPSEC, демонстрирующие, что мономер, полученный путем восстановления, имеет то же молекулярное распределение, что и нативный мономер. На фиг.7 (SDS-PAGE) показано, что мономер RBD, регенерированный путем восстановления (дорожка 3), имеет тот же паттерн миграции, что и нативный мономер RBD (дорожка 2, нативная конформация), в противоположность контрольному образцу, подвергнутому жестким условиям для восстановления меж- и внутримолекулярных мостиков (дорожка 4), который демонстрирует более медленную миграцию.

Антигенность мономера, полученного путем восстановления, анализировали посредством непрямого ELISA с использованием сыворотки выздоровевшего после COVID-19 человека. На фиг.8 показано, что RBD, регенерированный посредством восстановления, распознавался также, как и нативный RBD, в то время как мономер RBD, восстановленный в жестких условиях, разрушающих меж- и внутримолекулярные дисульфидные мостики (тотальное, C-), не распознается сывороткой.

Пример 2. Получение конъюгата RBD (319-541)-столбнячный токсин

Функционализация белка-носителя: белок-носитель столбнячный токсин (5 мг/мл) в буфере HEPES (100 mM, pH 7,8) подвергали реакции с N-гидроксисукцинимидным эфиром малеимида-пропионовой кислоты в DMSO (75 мг/мл), медленно капельно добавленным в реакционную смесь. Реакционную смесь выдерживали в течение часа при температуре окружающей среды. Функционализированный столбнячный токсин очищали посредством диафильтрации путем промывания буфером PBS (35 mM, pH 7,4) с 5 mM EDTA. Степень функционализации определяли по модифицированной методике Элмана.

Конъюгация: функционализированный столбнячный токсин добавляли к раствору RBD в его мономерной форме и к раствору RBD *in situ*, восстановленному до мономера, в молярном соотношении RBD/ТТ от 0,2 до 0,4. Реакционную смесь держали в атмосфере аргона при осторожном перемешивании в течение от 4 до 18 ч при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Для блокирования остальных малеимидных групп добавляли гидрохлорид цистеина в концентрации вплоть до 157 мкМ и перемешивание продолжали в течение 30 мин.

Очистка: очистку проводили посредством диафильтрации с использованием мембраны с величиной MWCO 100 кДа с промыванием PBS (6 mM, pH 7,0).

Соотношение RBD/ТТ определяли путем комбинирования денситометрии и колориметрии дот-блота. Содержание неконъюгированного RBD и распределение молекулярного размера определяли посредством HPSEC. Молекулярный размер и индекс

полидисперсности определяли посредством динамического рассеяния света (DLS). В таблице 1 показано, что молярное соотношение конъюгатов находится в диапазоне от 1,8 до 6,3 моль RBD/моль ТТ, в то время как содержание несвязанного RBD составляет менее 15%. Константа распределения молекулярного размера (K_d) демонстрирует увеличение молекулярного размера конъюгатов по сравнению со столбнячным токсинидом ($K_d=0,31$). Также было показано, что относительный размер совокупности конъюгатов возрастал при включении большего количества моль RBD в белок-носитель (таблица 1 и фиг.9).

Таблица 1. Физико-химическая характеристика конъюгатов RBD-ТТ.

RBD- ТТ	Конъюгированный мономер RBD	Молярно		Молекулярный размер (нм)	Индекс полидисперсности	Несвязанный RBD
		е	K_d			
		соотношение RBD/ТТ				
RBD- ТТ 1	Мономер	1,8	0,28	-	-	0%
RBD- ТТ 2	Восстановленный мономер*	2,1	0,27	13,02	0,262	0%
RBD- ТТ 3	Мономер	6,3	0,22	23,10	0,273	10,1%
RBD- ТТ 4	Восстановленный мономер*	9,5	0,19	25,32	0,294	5%
RBD- ТТ 5	Восстановленный мономер*	13,7	0,14	-	-	6%
ТТ	-	-	0,31	8,75	0,192	-

*Мономер, регенерированный посредством восстановления *in situ* димера RBD

Пример 3. Демонстрация распознавания конъюгата RBD (319-541)-столбнячный токсинид рецептором ACE 2 и специфическими антителами.

Распознавание конъюгата RBD-столбнячный токсинид (RBD-ТТ) рецептором ACE2 анализировали посредством теста ELISA, в котором планшет покрывали рекомбинантным рецептором ACE2. Образцы (партии 1 и 2 RBD-ТТ, димер RBD в качестве положительного контроля и hPDLNys в качестве отрицательного контроля) добавляли в разных концентрациях (0,001; 0,004; 0,019; 0,078; 0,3125; 1,25 и 5 мкг/мл). После инкубации добавляли RBD-специфическую поликлональную сыворотку кролика, а затем противокроличий IgG, конъюгированный с пероксидазой. Реакцию проявляли посредством соответствующего субстрата и проводили считывание при 405 нм.

На фиг.10А показано, что две партии конъюгата распознаются рецептором ACE2, а также димером RBD (положительный контроль). Таким образом, показано, что

восстановление *in situ* и конъюгация не влияют на эпитопы RBD, ответственные за распознавание RBD рецептором ACE2.

Антигенность RBD-ТТ подтверждали посредством дот-блоттинга с использованием специфической сыворотки с поликлональными IgG против RBD. На фиг.10В показано, что конъюгат хорошо распознается специфическими антителами против RBD в каждом протестированном разведении, в то время как столбнячный токсин (ТТ), примененный в разведении 1:80, не распознается. Таким образом, продемонстрировано, что конъюгация не влияет на распознавание RBD антителами.

Пример 4. Конъюгат RBD (319-541)-ТТ индуцирует сильный антителыный ответ у мышей BALB/c.

Мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно на 0 и 14 сутки посредством 0,1 мл одного из следующих составов:

- группа 1: 1 мкг RBD-(319-541)-ТТ,
- группа 2: 1 мкг RBD-(319-541)-ТТ, адсорбированного на 500 мкг Al(OH)₃,
- группа 3: 3 мкг RBD-(319-541)-ТТ,
- группа 4: 3 мкг RBD-(319-541)-ТТ, адсорбированного на 500 мкг Al(OH)₃,
- группа 5: 3 мкг RBD-(319-541)-ТТ, адсорбированного на 500 мкг Al(OH)₃,
- группа 6: плацебо: PBS и 500 мкг Al(OH)₃.

Группа 6 представляет собой отрицательный контрольный состав.

Кровь экстрагировали на 7, 14, 21 и 28 сутки. Сыворотки животных анализировали посредством непрямого ELISA для определения титра антител против RBD. 96-луночные микропланшеты для титрования NUNC Maxisorp покрывали 50 мкл RBD (3 мкг/мл) в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Затем планшеты промывали три раза промывочным раствором. Затем, непокрытые участки блокировали 100 мкл 5% обезжиренного молока в течение 1 часа при 37°C. После промывания планшетов вновь, как описано, добавляли сыворотки (50 мкл/лунка), разбавленные 1:3 в фосфатном буфере (pH 7,2) с 1% BSA в серийных разведениях, в основном начинающихся с разведения 1:50. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C и вновь промывали. Затем добавляли 50 мкл разведения противомышиного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в фосфатном буфере (pH 7,2) с 1% BSA (1:5000) и инкубировали в течение одного часа. После одного последнего промывания использовали раствор субстрата фермента пероксидазы (50 мкл/лунка). Затем его инкубировали в темноте в течение 20 минут и реакцию останавливали 50 мкл/лунка 2 N H₂SO₄. Считывание поглощения проводили при 450 нм в устройстве для считывания Multiskan EX ELISA reader (Thermo Scientific). Титр IgG определяли как обратную величину разведения сыворотки, достигающего четырехкратной величины среднего значения поглощения доиммунной сыворотки (T₀) в разведении 1:50. Для анализа и представления результатов вычисляли Log₁₀ титра для каждого животного. Для определения отвечающих животных в качестве пороговой величины использовался log титра > 1,70, соответствующий разведению сыворотки > 1:50. Величина титра 25 и log₁₀ 1,4 были

установлены для животных, чей титр был ниже, чем предел детекции в анализе.

На фиг.11 показано, что ответ IgG, индуцированный иммунизацией 3 мкг RBD-ТТ с адъювантом $Al(OH)_3$, индуцирует ранний ответ антител (на 7 и 14 сутки после иммунизации), который является значимо более сильным ($p < 0,05$), чем ответ, индуцируемый той же дозой неконъюгированного RBD с адъювантом $Al(OH)_3$. Это свойство объясняется конъюгацией RBD с белком-носителем. Также известно, что 1 мкг RBD-ТТ с адъювантом $Al(OH)_3$ индуцирует кинетику антител, сходную с кинетикой, индуцированной 3 мкг неконъюгированного RBD, демонстрируя, что конъюгация усиливает ответ на антиген.

Также заметно, что конъюгаты с адъювантом повышают уровень антител против RBD по сравнению с той же дозой составов без адъюванта.

Пример 5. Титр антител против столбнячного токсоида, индуцированный конъюгатом RBD (319-541)-ТТ

Сыворотки, полученные от мышей на 7, 14, 21 и 28 сутки после иммунизации по методикам, описанным в примере 4, использовали для оценки индукции антител против ТТ. 96-луночные микропланшеты для титрования NUNC Maxisorp покрывали 100 мкл столбнячного токсоида в концентрации 2,5 мкг/мл в PBS (pH 7,2) и инкубировали в течение ночи при 4°C во влажной камере. Планшеты промывали три раза промывочным раствором. Добавляли сыворотки (100 мкл/лунка) в разных разведениях в фосфатном буфере (pH 7,2) с 1% BSA. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C и вновь промывали. Затем добавляли 100 мкл разведения противомышиного IgG, конъюгированного с пероксидазой, в фосфатном буфере (pH 7,2) с 1% BSA (1:10000) в течение одного часа при 37°C. После одного последнего промывания использовали 100 мкл/лунка раствора субстрата фермента пероксидазы, инкубировали в темноте в течение 25 минут и реакцию останавливали 2 N H_2SO_4 (50 мкл/лунка). Считывание поглощения проводили при 450 нм в устройстве для считывания Multiskan EX ELISA reader (Thermo Scientific). Титр определяли путем преобразования величин поглощения в МЕ/мл (международные единицы на миллилитр); для построения референсной кривой на основе серийных разведений стандарта использовали четырехпараметрическую логарифмическую логистическую функцию.

На фиг.12 показано, что составы, содержавшие конъюгат с адъювантом $Al(OH)_3$, индуцировали значимо более сильный ответ IgG против ТТ ($p < 0,05$), чем ответ, индуцированный составами без адъюванта.

Пример 6. Функциональная активность антител против RBD, индуцированных конъюгатом RBD (319-541)-столбнячный токсид, оцененная посредством анализа ингибирования взаимодействия RBD-ACE2.

Сыворотки, полученные от мышей на 28 сутки после их иммунизации в соответствии с методикой, описанной в Примере 4, анализировали в тесте ELISA для определения ингибирования ими взаимодействия RBD-ACE2. Другой тест ELISA проводили для анализа ингибирования взаимодействия RBD-ACE2, индуцированного

антителами против RBD. Для определения процента ингибирования взаимодействия RBD-ACE2 планшеты, покрытые ACE2-Fc мыши (5 мкг/мл), блокировали; затем добавляли RBD-Fc человека, инкубированный в течение 1 ч при 37°C с сыворотками мышей, иммунизированных различными экспериментальными составами, в разведениях в диапазоне от 1:25 до 1:10000. Для детекции распознавания использовали конъюгат противочеловеческий IgG (специфичный к гамма-цепи)-щелочная фосфатаза, разбавленный в буфере SSTF-T с 0,2% молоком. После одного последнего промывания использовали pNPP (1 мкг/мл, 50 мкл/лунка) в буфере диэтаноламине. Планшеты инкубировали в темноте в течение 20 минут и реакцию останавливали 3 М NaOH (50 мкл/лунка). Считывание поглощения проводили при 405 нм. Процент ингибирования вычисляли по следующей формуле: $(1 - \text{Abs}_{405 \text{ нм RBD-Fc человека}} + \text{сыворотка мыши}) / \text{Abs}_{405 \text{ нм RBD-Fc человека}} * 100$. Максимальную ингибиторную концентрацию (IC 50) определяли посредством нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad 7.00 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, CA, США). На фиг.13 представлена способность к ингибированию сыворотки мышей, иммунизированных составом по настоящему изобретению. Антитела, индуцированные составами RBD-TT с адьювантом, имеют более высокую способность к ингибированию, чем антитела, индуцированные составами без адьювантов. Более того, способность к ингибированию (IC₅₀) составов с адьювантом в 2 (1 мкг RBD-TT/Al(OH)₃) и 6,5 (3 мкг RBD-TT/Al(OH)₃) раз превышает способность к ингибированию у неконъюгированного состава (3 мкг RBD/Al(OH)₃), что демонстрирует, что конъюгация RBD повышает функциональность антител даже в более низких дозах.

Пример 7. Функциональная активность антител против RBD, индуцированных составом конъюгата RBD (319-541)-столбнячный токсин, оцененная посредством их способности нейтрализовать SARS-CoV-2.

Способность к нейтрализации SARS-CoV-2 у сывороток мышей, иммунизированных 3 мкг RBD-TT/Al(OH)₃ и 3 мкг RBD/Al(OH)₃ на 28 суток после первой дозы (Пример 4), тестировали посредством колориметрического анализа с использованием Neutral Red. Клетки Vero E6 инкубировали в MEM, дополненной 2% эмбриональной телячьей сывороткой, 25 мМ/мл L-глутамина, 2 мкг/мл бикарбоната, 80 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл амфотерицина В. Супернатант удаляли из планшета и добавляли PBS, pH 7,2, содержащий 0,02% Neutral Red (100 мкл/лунка). Планшеты инкубировали в течение одного часа при температуре окружающей среды. Раствор сливали и монослои клеток промывали два раза стерильным PBS, 0,05% Tween 20. Добавляли лизирующий раствор (абсолютный этанол: сверхчистая вода: ледяная уксусная кислота, 50:49:1) (100 мкл/лунка). Планшет инкубировали в течение 15 мин при температуре окружающей среды и измеряли при 540 нм в спектрофотометре. Титр нейтрализации представлял собой наиболее высокое разведение сыворотки с величиной оптической плотности, превышающей пороговое значение. Пороговое значение представляло собой среднее значение оптической плотности для лунок, соответствующих

клеточному контролю, деленое на два.

На фиг.14 показано, что титры нейтрализующих антител, индуцированных конъюгатом RBD-TT, являются значимо более высокими ($p < 0,01$), чем титры, индуцируемые неконъюгированным RBD, демонстрируя превосходство конъюгации RBD, поскольку она повышает функциональность индуцируемых антител.

Пример 8. Иммунный ответ Th1-клеток при определении по IFN γ , индуцируемому конъюгатом RBD (319-541)-столбнячный токсид.

Клеточный иммунный ответ оценивали у мышей, иммунизированных по методике, описанной в Примере 4, после получения сывороток на 21 сутки после иммунизации. Спленоциты мышей, иммунизированных либо 1 мкг RBD-TT в Al(OH)₃, либо плацебо Al(OH)₃, выделяли и повторно стимулировали *in vitro* посредством RBD (5 мкг/мл) при определении посредством количественного ELISA. Использованная концентрация составляла 1×10^6 клеток/мл. IL4, IL17A и IFN γ определяли в культуральном супернатанте после стимуляции в течение 72 часов.

На фиг.15 показано, что иммунизация 1 мкг RBD-TT/Al(OH)₃ индуцирует IFN γ , демонстрируя поляризацию Т-клеточного ответа в сторону Th1. IL4 и IL17A не обнаруживались, что свидетельствует о том, что конъюгат не вызывает поляризацию в сторону ответа по паттерну Th2 или Th17.

Пример 9. Ответ Т-клеток памяти, специфичный к белку RBD SARS-CoV-2, индуцируемый конъюгатом RBD (319-541)-столбнячный токсид.

Ответ Т-клеток памяти оценивали у мышей, иммунизированных по методике, описанной в Примере 4, на 21 сутки после иммунизации. Спленоциты мышей, иммунизированных либо 1 мкг RBD-TT, составленного в Al(OH)₃, либо плацебо (Al(OH)₃), выделяли, культивировали в RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 100 Е пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пируватом, 50 мкМ β -меркаптоэтанолом и 20 Е/мл IL-2 в течение 72 часов. Для активации клеток добавляли 5 мкг/мл RBD. Для блокирования секреции цитокинов добавляли Брефелдин А (BD Biosciences) за 4-6 часов до окрашивания. Клетки промывали PBS 1X и окрашивали в течение 30 мин при 4°C против CD8, против CD4, против CD44 и против CD220 (BioLegend). Клетки фиксировали, и их проницаемость повышали для облегчения внутриклеточного окрашивания против IFN γ и против IL4 (BioLegend). Данные цитометрии получали на проточном цитометре Gallios (Beckman Coulter) и результаты обрабатывали посредством программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter).

На фиг.16 показано, что иммунизация 1 мкг RBD-TT/Al(OH)₃ индуцирует RBD-специфические CD4⁺ (C) и CD8⁺ (A) Т-клетки памяти с фенотипом CD44⁺⁺. Иммунизация также повышала уровень CD8 (B) и CD4 (D) Т-клеток памяти, продуцирующих IFN γ .

Пример 10. Получение RBD (328-533), тиолированного на его N-конце

RBD (328-533) в конечной концентрации 20-200 мкМ в 5-10 мл PBS (50 мМ, pH 7,5, 5 мМ EDTA) обрабатывали 2-тиоацетилпиридин-2-карбоксальдегидом (конечная концентрация 1-10 мМ). Реакционную смесь перемешивали при температуре 23-37°C в

течение периода времени от 12 до 48 ч. Очистку проводили посредством диафильтрации путем промывания PBS (35 мМ, pH 7,4, 5 мМ EDTA). Функционализированный RBD (328-533) концентрировали до 20-200 мкМ и обрабатывали гидрохлоридом гидроксилamina до конечной концентрации 40 мМ. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в атмосфере азота в течение 1-5 ч, и была определена степень конвертирования >90% по методике Элмана.

Уровень конвертирования N-концевого остатка, определенный посредством масс-спектрометрии, превышал 80%. Анализ HPSEC показал, что в ходе реакции агрегация не происходила, и что тиолированный RBD сохранял его распределение молекулярного размера (фиг.17).

Пример 11. Конвертирование N-концевого тиолированного RBD (328-533) в конъюгат RBD (328-533)-столбнячный токсин.

Тиолированный RBD (328-533) конъюгируют со столбнячным токсином по методике, описанной в Примере 2.

На фиг.18A представлены хроматограммы HPSEC Superdex 75 для RBD, реакционной смеси после конъюгации в течение 16 ч и очищенного конъюгата. Очищенный конъюгат имеет молярное соотношение RBD-ТТ 1,9 и содержание несвязанного RBD менее 15%. Хроматограмма HPSEC Superdex 200 (фиг.18B) демонстрирует увеличение молекулярного размера конъюгата ($K_d=0,27$) по сравнению с белком-носителем ($K_d=0,31$).

Конъюгаты, полученные из SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:3 в соответствии с методикой, описанной в Примере 2, имеют сходные физико-химические характеристики.

Пример 12. Сохранение распознавания конъюгата RBD (328-533)-столбнячный токсин рецептором ACE2 и специфическими антителами против RBD.

Распознавание конъюгата RBD-столбнячный токсин рецептором ACE2 и специфическими антителами против RBD оценивали, как описано в примере 3.

На фиг.19A показано, что конъюгат RBD-столбнячный токсин распознается рецептором ACE2, а также он распознается положительным контролем RBD (RBD в отсутствие столбнячного токсина). Таким образом, показано, что ни тиолирование N-концевого остатка RBD, ни процессы конъюгации не влияют на эпитопы RBD, ответственные за распознавание RBD рецептором ACE2.

Антигенность конъюгата подтверждали посредством дот-блоттинга с использованием сыворотки с RBD-специфическими поликлональными IgG. На фиг.19B показано, что конъюгат хорошо распознается антителами, специфичными к RBD, во всех протестированных разведениях, в то время как столбнячный токсин (ТТ) в разведении 1:80 не распознается. Таким образом, показано, что конъюгация не влияет на распознавание RBD антителами.

Пример 13. Конъюгат RBD (319-541)-ТТ индуцирует сильный антителы ответ у человека, особенно в педиатрической популяции.

Вакцинный состав, который включает RBD-(319-541)-ТТ в квасцах, оценивали в

клинических испытаниях по схеме с двумя дозами (T0, T28 суток). Методики в клинических испытаниях у взрослых (фаза II, возраст 19-80 лет) и в педиатрической популяции (фаза I/II, возраст 3-18 лет) описаны на: <https://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000347-En>, <https://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000374-En>.

На фиг.20 представлены результаты специфических IgG против RBD в сыворотки через 14 суток после второй дозы в обоих клинических испытаниях. Высокие уровни антител индуцировались во всех возрастных группах с сероконверсией 74% во взрослой популяции (19-80 лет). Следует отметить, что дети достигали сероконверсии 92,8% и 99,3% в группах 12-18 лет и 3-11 лет, соответственно. Кроме того, медианы обеих педиатрических групп: 50,3 (15,9; 62,0 в 12-18 лет) и 99,8 (39,1; 216,8 в 3-11 лет) были более высокими, чем медианы в панели сывороток, полученной от детей, выздоровевших после COVID-19: 8,7 (3,4; 15,7).

Пример 14. Конъюгат RBD (319-541)-ТТ индуцирует специфические мукозальные IgG у человека

Слюну индивидуумов, иммунизированных двумя дозами (T0, 28 суток) состава RBD-(319-541)-ТТ в квасцах и бустерной дозой димерного RBD в квасцах (T56), как описано на: <https://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000360-En>, анализировали посредством "собственного" анализа ELISA с RBD в качестве покрытия (5 мкг/мл) и PBS-3% BSA для блокирования. Образцы слюны оценивали чистыми в двух экземплярах. После стадий инкубации добавляли конъюгат пероксидаза-противочеловеческий IgG (Sigma A6029, 1:2500) в соответствующем буфере. Конечную флуориметрическую реакцию индуцировали добавлением субстрата OPD. Результаты выражали в величинах поглощения.

На фиг.16 показано, что у индивидуумов, которых иммунизировали, индуцировался специфический ответ IgG против RBD в слюне.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

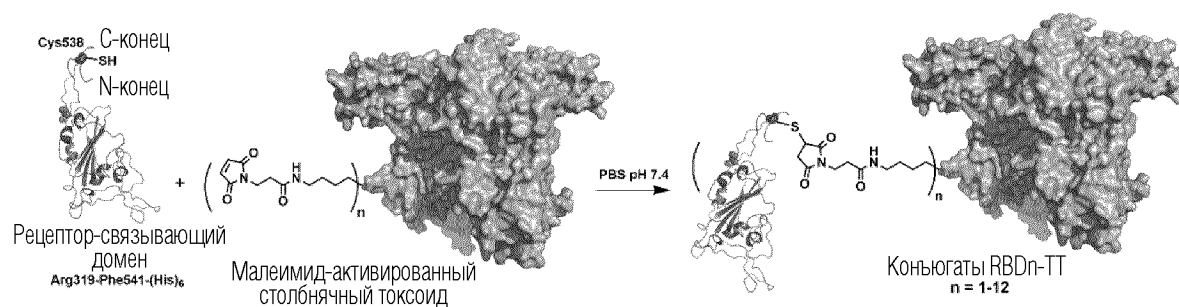
1. Ковалентный конъюгат, содержащий рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2 и белок-носитель.
2. Ковалентный конъюгат по п.1, где белок-носитель выбран из группы, включающей столбнячный токсин, дифтерийный токсин и мутант дифтерийного токсина CRM197.
3. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 1-2, где молярное соотношение RBD:белок-носитель находится в диапазоне от 1 до 8 RBD на белок-носитель.
4. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 1-3, где RBD выбран из группы, содержащей SEQ ID NO: 1, 2 и 3.
5. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 1-4, где RBD SEQ ID NO:1 используется в его димерной форме.
6. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 1-5, где RBD продуцируется хозяином, выбранным из группы, включающей: клетки млекопитающих, клетки насекомых, бактерии и дрожжи.
7. Вакцинная композиция, используемая для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, которая отличается тем, что она содержит ковалентный конъюгат по любому из пп. 1-5.
8. Вакцинная композиция по п.7, которая также включает адъювант, выбранный из группы, включающей: гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция.
9. Вакцинная композиция по п.7, где конъюгат присутствует в диапазоне концентраций RBD 1-30 мкг на дозу.
10. Вакцинная композиция по п.8, где адъювант присутствует в диапазоне концентраций 200-1500 мкг на дозу.
11. Вакцинная композиция по пп. 7-10, которая также включают соответствующие фармацевтические эксципиенты.
12. Процедура получения ковалентного конъюгата по любому из пп. 1-5, заключающаяся в следующих стадиях: А) функционализация белка-носителя для внесения тиофильных групп; В) ковалентная конъюгация белка-носителя с RBD и С) очистка.
13. Процедура по п.12, которая включает дополнительную стадию, состоящую в восстановлении *in situ* димера RBD перед стадией А.
14. Процедура по п.12, которая включает дополнительную стадию, состоящую в тиолировании N-конца RBD перед стадией А.
15. Процедура по п.13, где используют SEQ ID NO:1.
16. Процедура по п.14, где используют любой из SEQ ID NO:1-3.
17. Процедура по п.12, где тиофильные группы, внесенные на стадии А, выбраны из группы, включающей: малеинимид, бромацетил, винилсульфон, акрилат, акриламид, акрилонитрил и метакрилат.
18. Конъюгат, полученный в соответствии с процедурой по любому из пп. 12-17.
19. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 7-11 для профилактики

инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

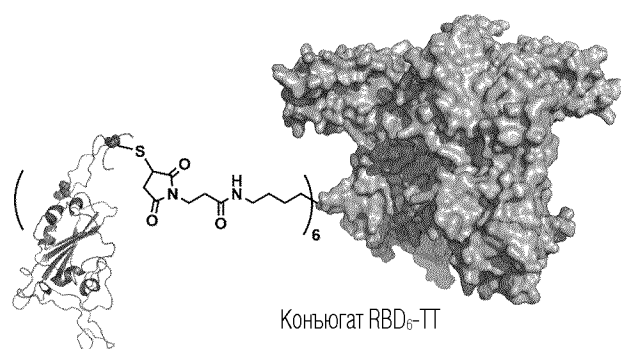
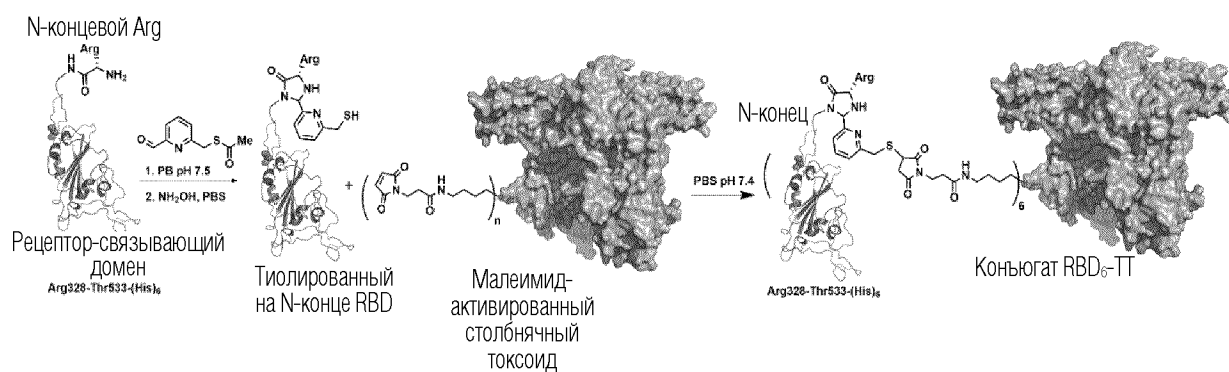
20. Применение вакцинной композиция по любому из пп. 7-11 для профилактики инфекции вирусом SARS-CoV-2, когда требуется ответ нейтрализующих антител после двух доз вакцинной композиции.

21. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 7-11 для индукции ответа антител к SARS-CoV-2 с использованием схемы внутримышечной вакцинации посредством 1-3 доз RBD от 1 до 30 мкг.

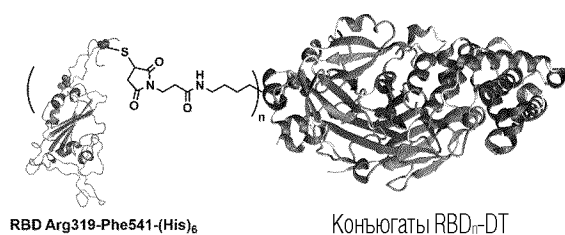
ФИГ. 1



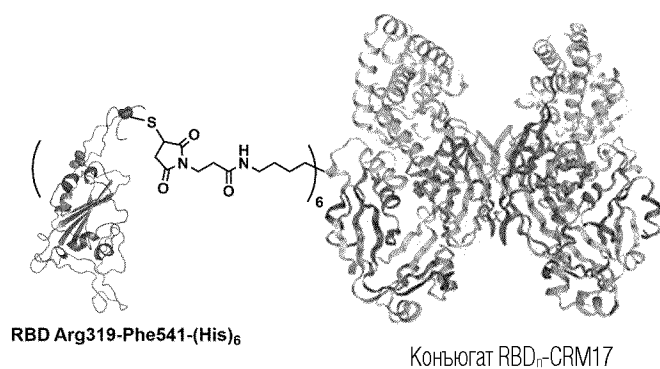
ФИГ. 2

RBD Arg319-Phe541-(His)₆

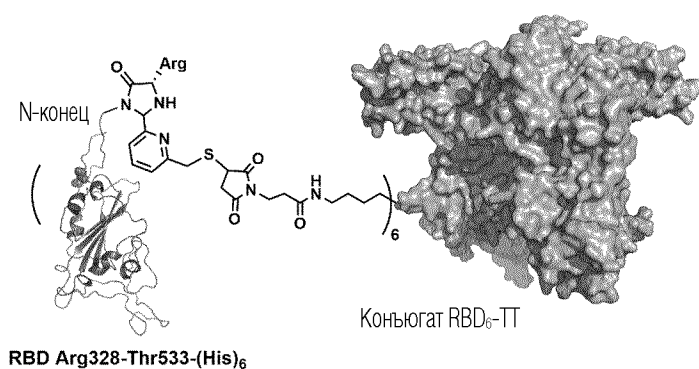
ФИГ. 3А

RBD Arg319-Phe541-(His)₆

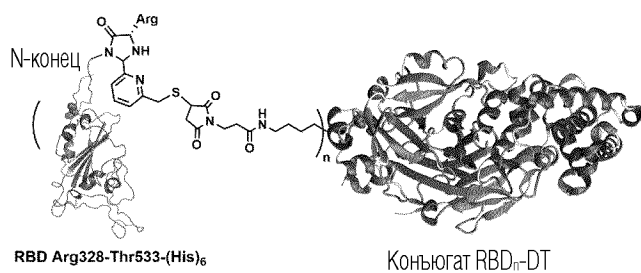
ФИГ. 3В



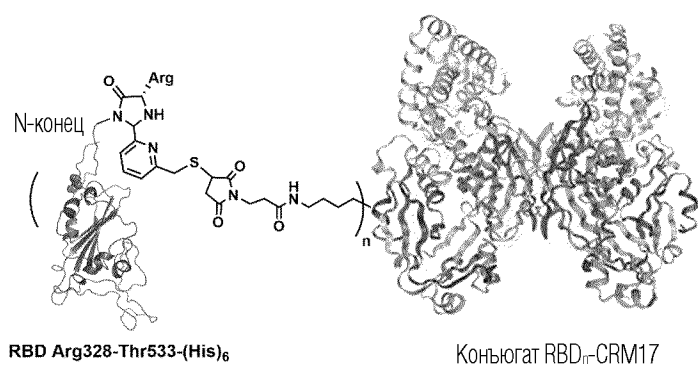
ФИГ. 3С



ФИГ. 4А

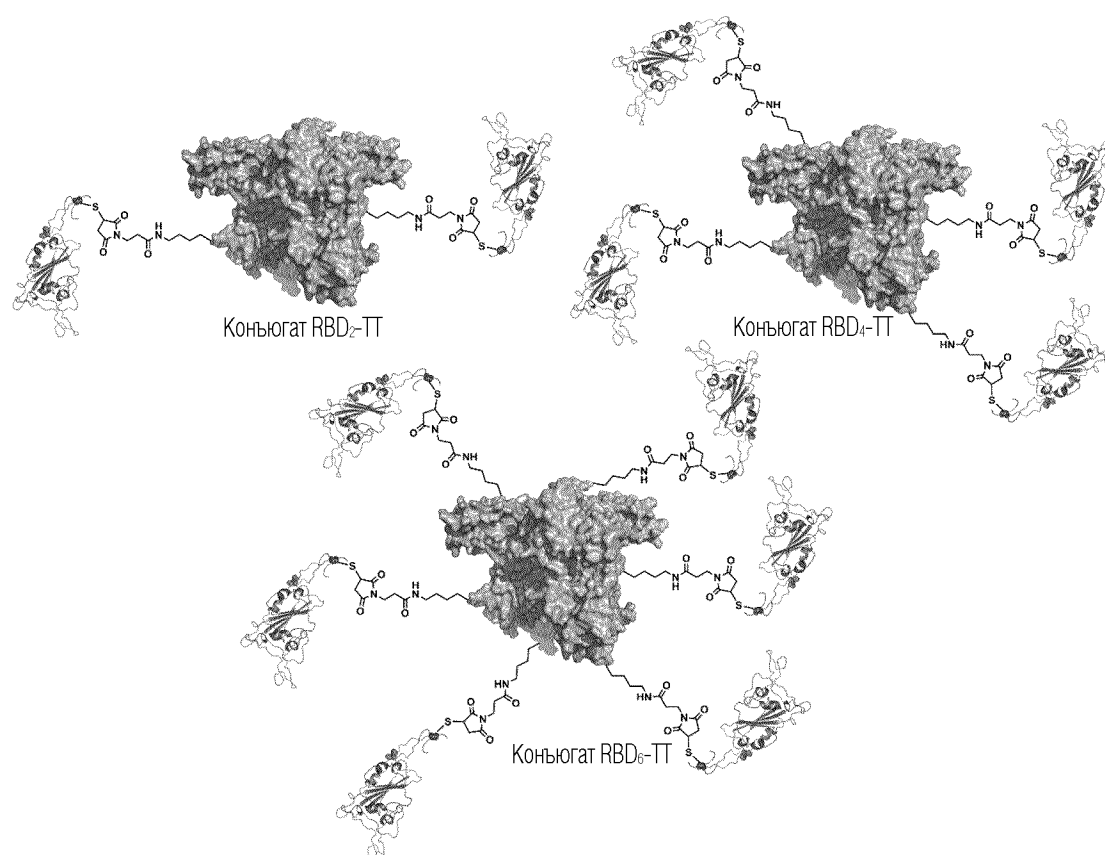


ФИГ. 4В

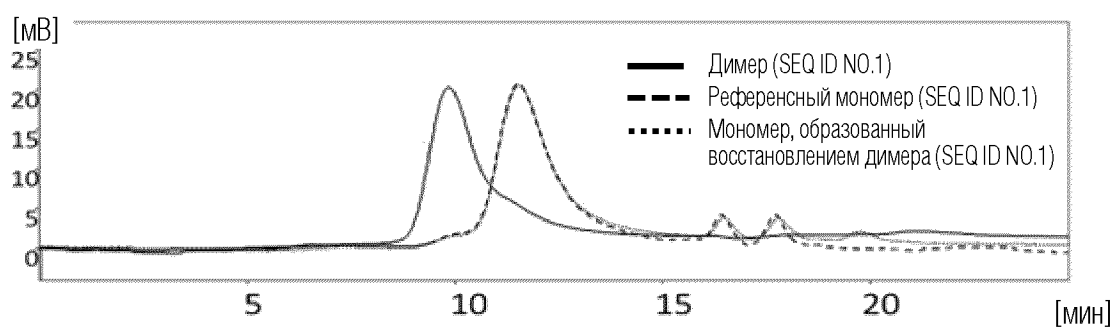


ФИГ. 4С

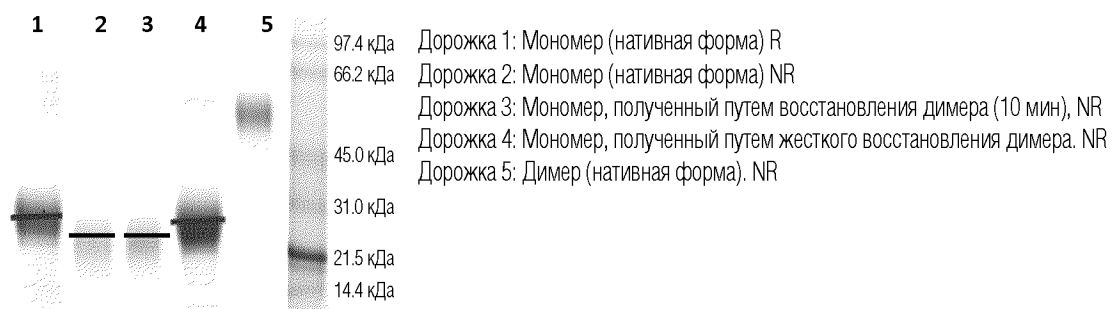
ФИГ. 5



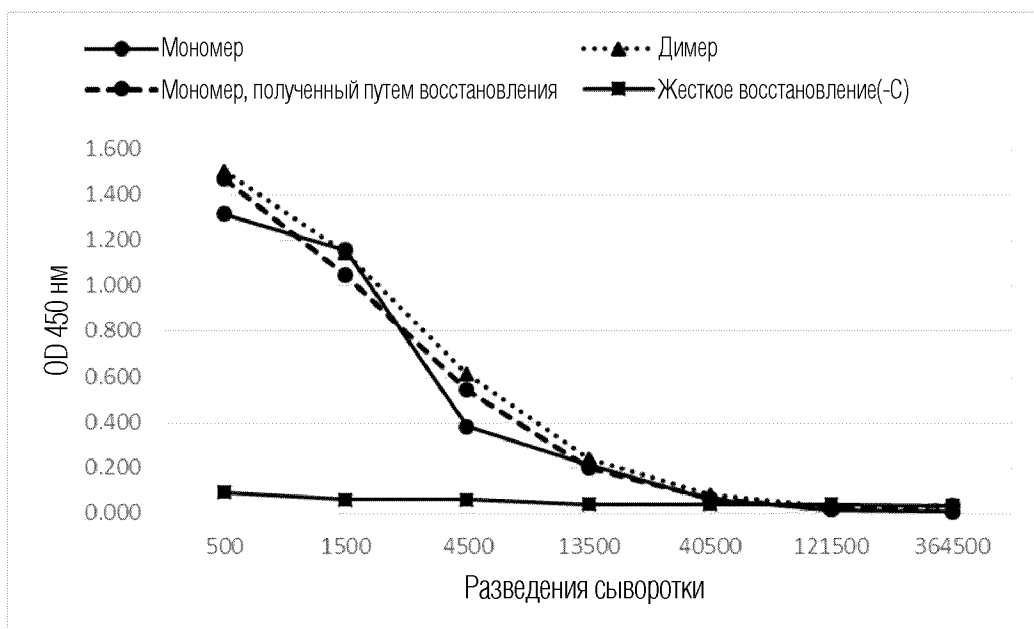
ФИГ. 6



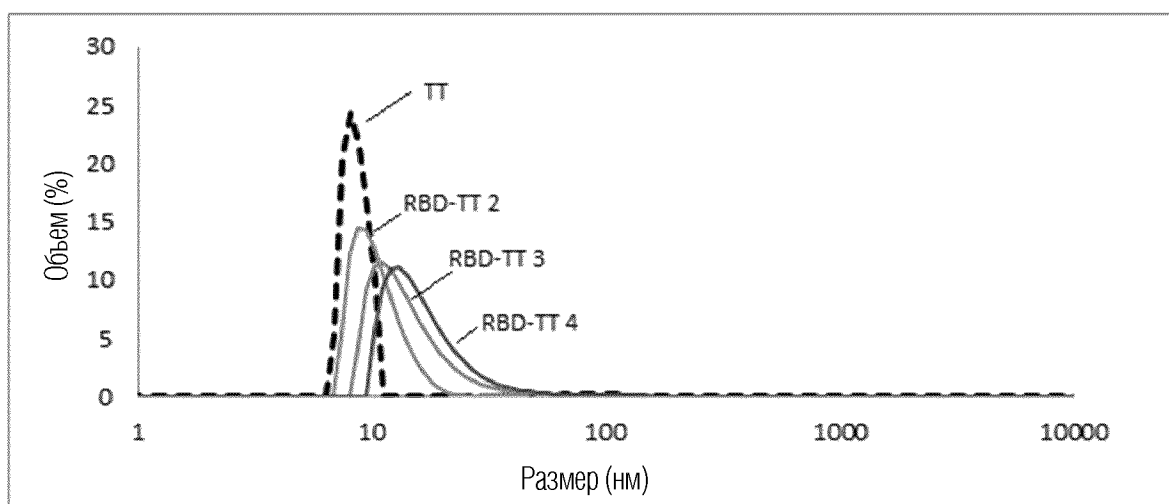
ФИГ. 7



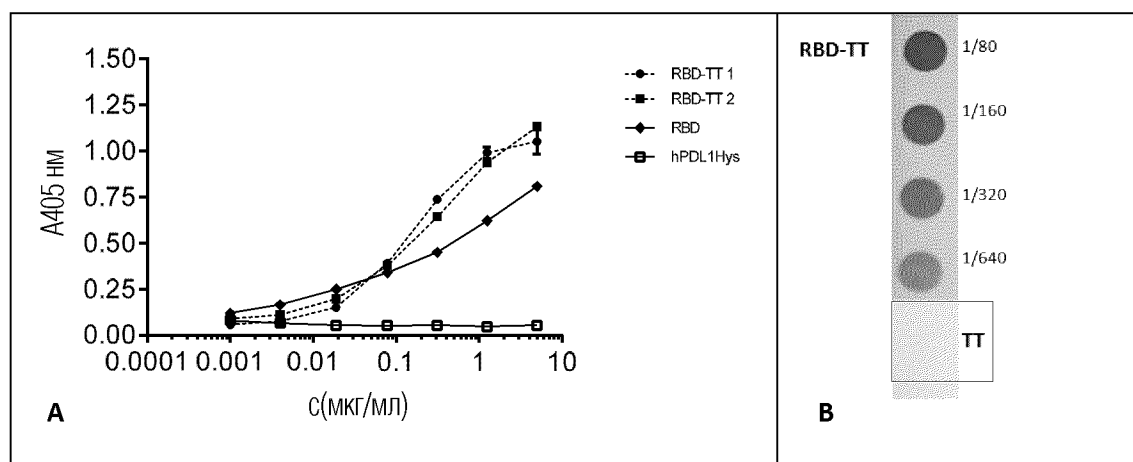
ФИГ. 8



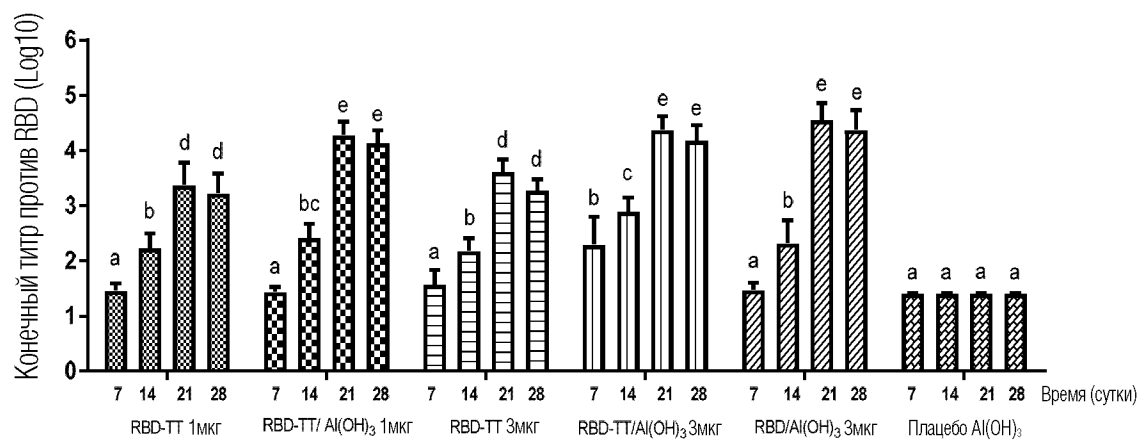
ФИГ. 9



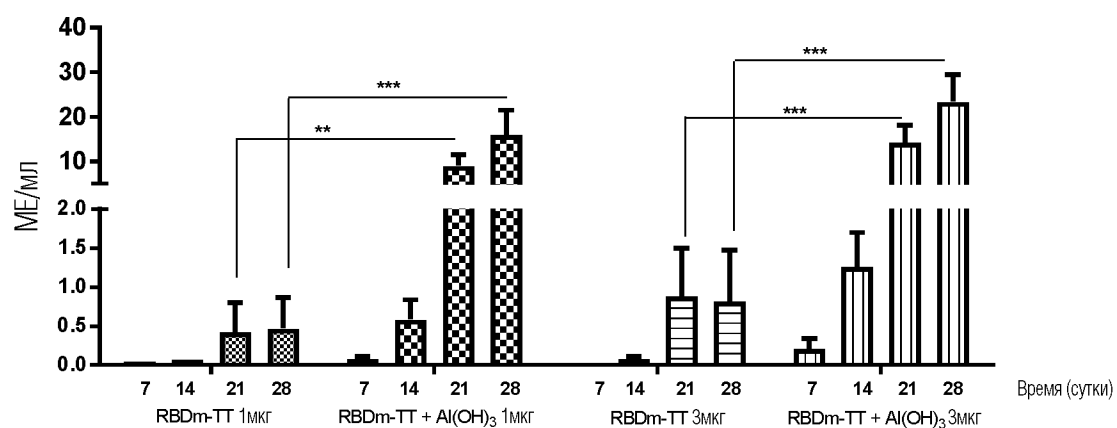
ФИГ. 10



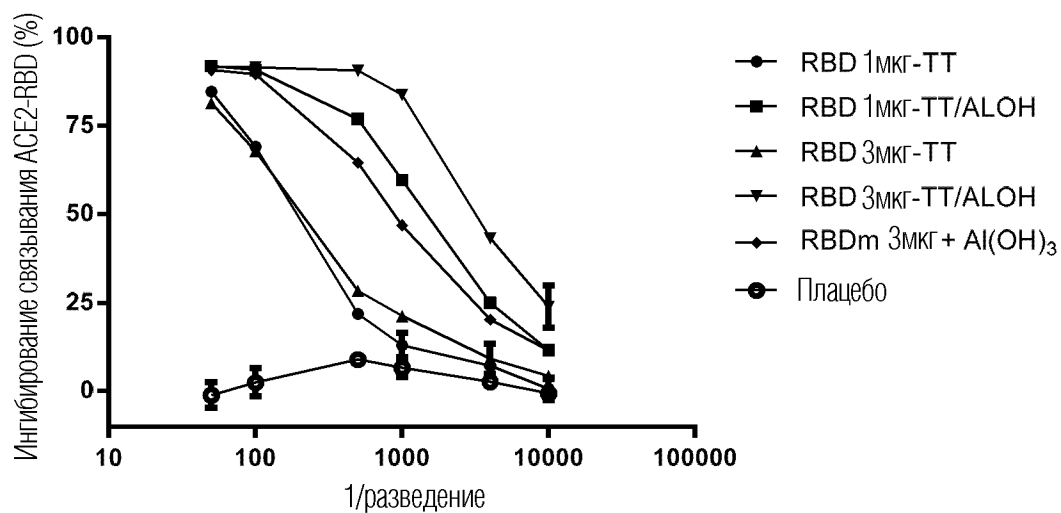
ФИГ. 11



ФИГ. 12

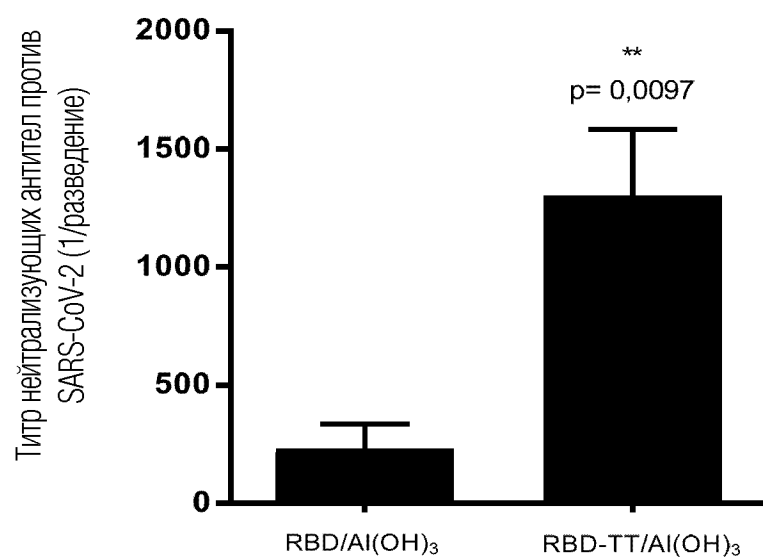


ФИГ. 13

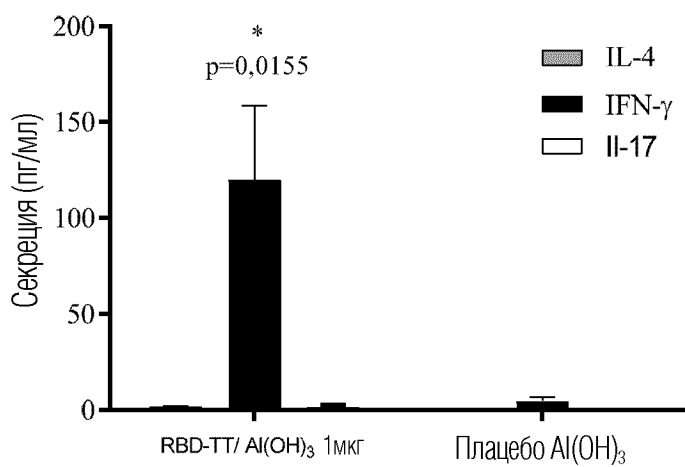


	RBD 1мкг-TT	RBD 1мкг-TT/ALOH	RBD 3мкг-TT	RBD 3мкг-TT/ALOH	RBDm 3мкг + Al(OH) ₃
LogIC ₅₀	2.084	3.269	2.253	3.771	2.954
IC ₅₀	121.2	1856	179.2	5907	899.7

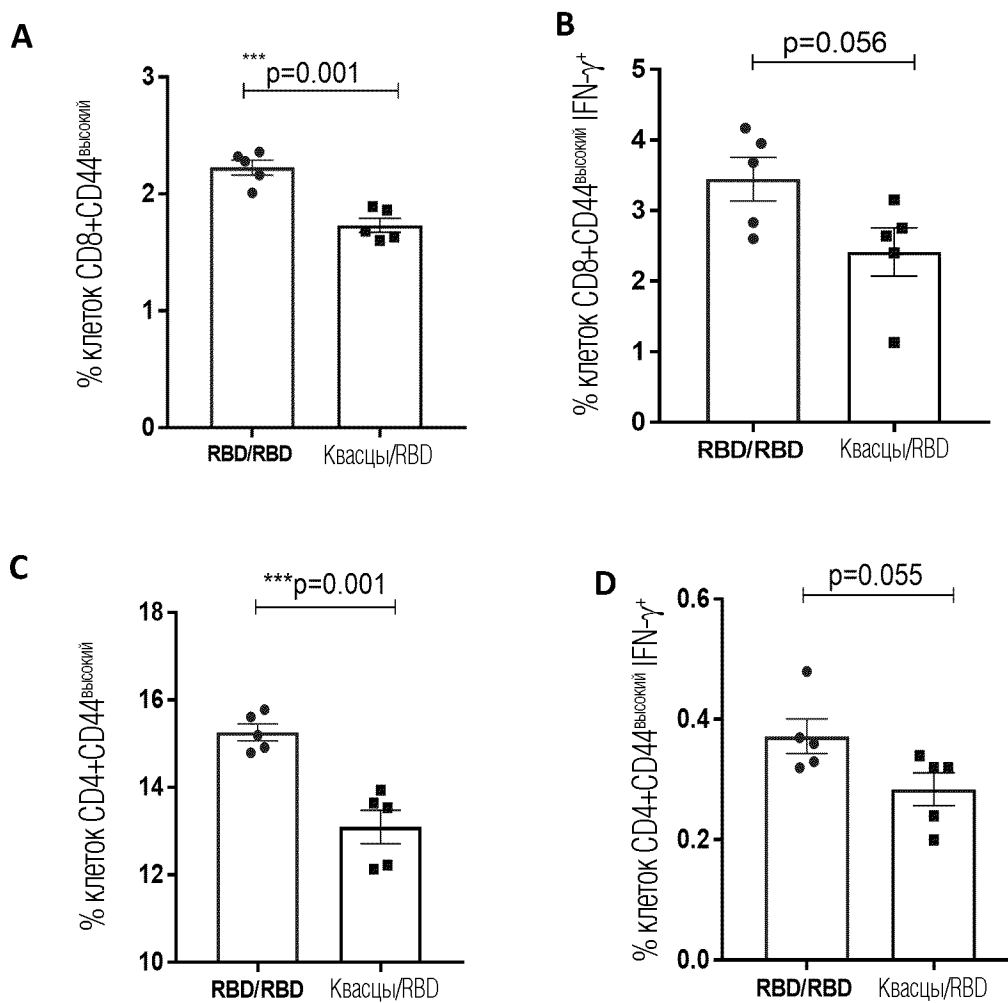
ФИГ. 14



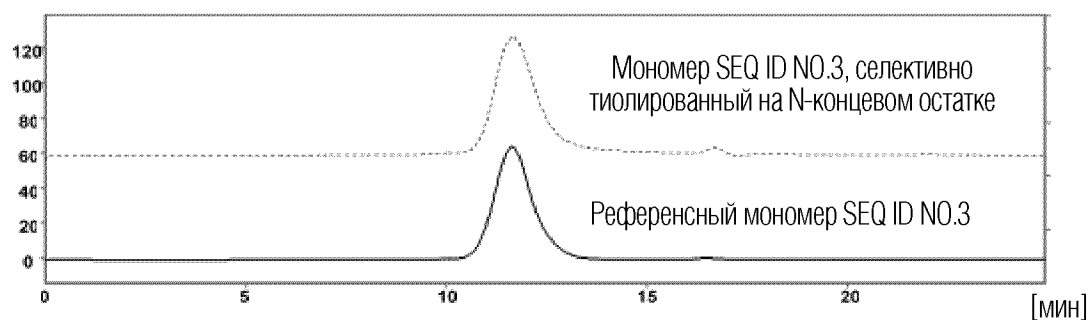
ФИГ. 15



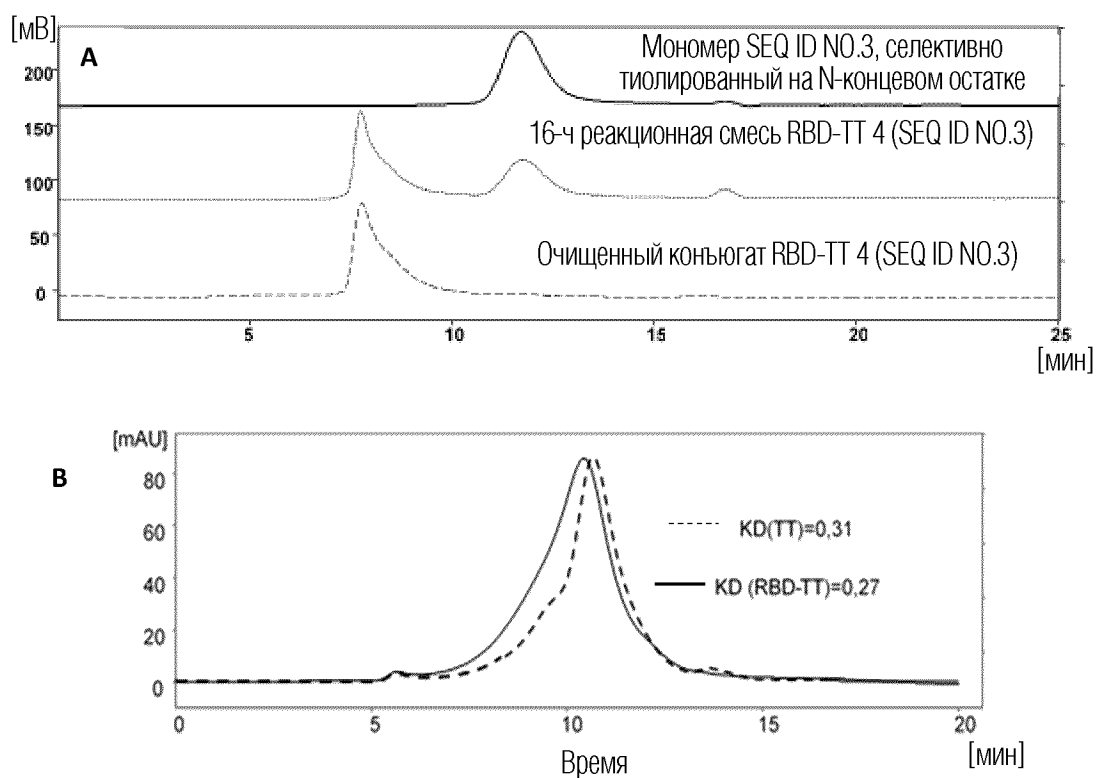
ФИГ. 16



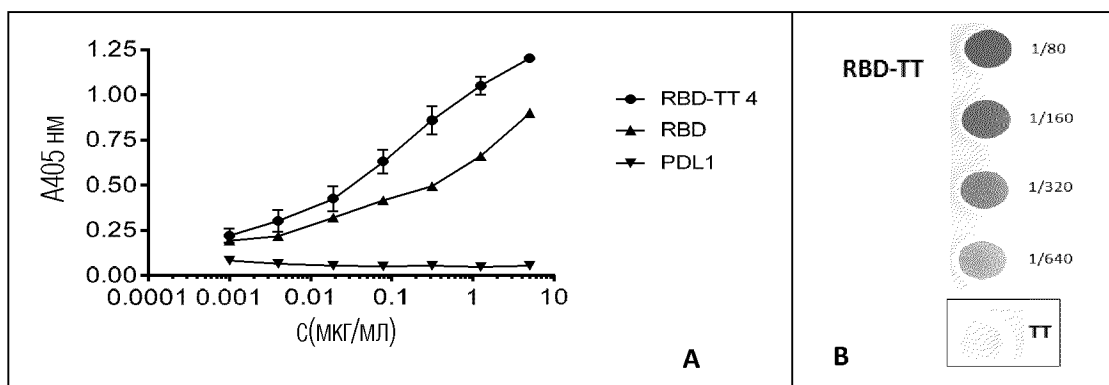
ФИГ. 17



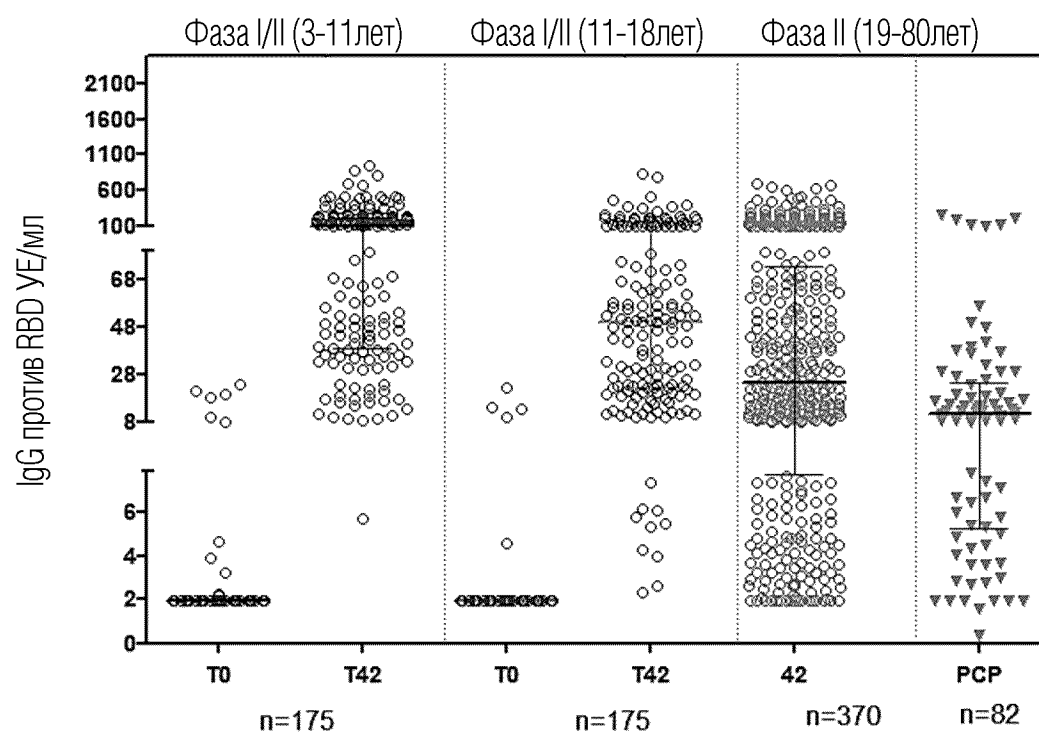
ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21

