

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045197**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.31(21) Номер заявки
202292334(22) Дата подачи заявки
2022.08.12(51) Int. Cl. **C07K 14/165** (2006.01)
C12N 15/07 (2006.01)
C12N 15/50 (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)**(54) АНТИГЕН SARS-COV-2, СОДЕРЖАЩИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ КОРОНАВИРУСА**(43) **2023.10.26**(96) **2022000075 (RU) 2022.08.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; АЛЕКСЕЕВ
АЛЕКСЕЙ ВИКТОРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:

**Духовлинов Илья Владимирович,
Алексеев Алексей Викторович,
Чирак Евгений Леонидович, Чирак
Елизавета Романовна, Рябченкова
Анастасия Андреевна, Копать
Владимир Владиславович, Карасёв
Евгений Сергеевич (RU)**

(74) Представитель:

Харин А.В. (RU)

(56) WO-A1-2021201777
US-A1-2021275665
WO-A1-2021214297
WO-A1-2021194940

Lin J et al. Longitudinal Assessment of SARS-CoV-2-Specific T Cell Cytokine-Producing Responses for 1 Year Reveals Persistence of Multicytokine Proliferative Responses, with Greater Immunity Associated with Disease Severity. JOURNAL OF VIROLOGY, 2022, Vol. 96, №13, p. 1-24 doi: 10.1128/jvi.00509-22. С. 14, таблица 2

US-A1-20070128217
WO-A1-2022120216

(57) Изобретение относится к области диагностики иммунного ответа на SARS-CoV-2 и включает гибридный антигенный белок, содержащий каждую из аминокислотных последовательностей следующих фрагментов структурных белков штамма SARS-CoV-2 MN908947: а) полная последовательность N белка, б) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 6-20 E белка, с) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 129-143 M белка, е) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 345-360 S белка, f) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 500-520 S белка, и, необязательно, d) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 36-50 E белка; или последовательностей гомологичных фрагментов из штамма SARS-CoV-2, отличающегося от MN908947; при этом белок характеризуется порядком b-c в направлении от N- к С-концу, а если присутствует фрагмент (d) - порядком b-c-d в направлении от N- к С-концу; а также нуклеиновую кислоту и вектор, кодирующие указанный белок, и клетку, содержащую их. Предложенный белок содержит антигенные детерминанты всех структурных белков SARS-CoV-2 и позволяет проводить эффективную диагностику как клеточного, так и гуморального иммунного ответа на перенесенную инфекцию.

B1**045197****045197****B1**

Настоящее изобретение относится, в общем, к гибридным белкам и, в частности, к антигенным белкам коронавируса, которые могут быть использованы в диагностических, научно-исследовательских и иных целях. Более конкретно, изобретение относится к гибриднему антигенному белку, содержащему последовательности всех структурных белков коронавируса, нуклеиновой кислоте, кодирующей этот белок, вектору, включающему эту нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей указанные белок, нуклеиновую кислоту и/или вектор и иным воплощениям.

Сведения о предшествующем уровне техники

О появлении коронавирусной инфекции 2019-nCov (COVID-19) в г. Ухань, провинция Хубей, КНР, стало известно в декабре 2019 г., и уже спустя три месяца Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) объявила о пандемии. Влияние пандемии COVID-19 на экономику и социальную сферу является колоссальным и связано не только с высокой летальностью и потерей трудоспособности, но и карантинными и иными мерами, введенными во многих странах мира.

По оценке ВОЗ, избыточная смертность в 2020-2021 гг., вызванная COVID-19, составила около 14,9 млн человек (David Adam, "15 million people have died in the pandemic, WHO says", Nature 605, 206 (2022)). Хотя число новых случаев заболевания и смертность с течением времени снижаются, экспертное сообщество не пришло к пониманию, когда следует ожидать окончания пандемии; высказываются предположения о том, что аналогично гриппу коронавирусная инфекция будет поддерживаться в человеческом сообществе в течение неопределенно долгого времени, периодически иницируя "волны" эпидемий или пандемий (Lindsay Smith Rogers, "Where We Are in the Pandemic", May 24, 2022, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health).

В этих обстоятельствах на первый план выходит оперативность создания профилактических, терапевтических и диагностических средств и методов, а сообщество исследователей заинтересовано в надежных и универсальных инструментах, необходимых при разработке указанных средств и методов. Более того, так же, как и медики, контактирующие с больными COVID-19, исследователи, разрабатывающие профилактические, терапевтические и диагностические средства и методы и имеющие дело с инфекционным агентом, входят в группу риска, а, следовательно, имеется потребность в создании таких инструментов исследователя, позволяющих в определенных случаях отказаться от использования непосредственно инфекционного агента.

Возбудитель COVID-19 - коронавирус SARS-CoV-2, геном которого представляет собой одноцепочечную смысловую РНК размером около 29,9 кб; структурные белки: N (белок нуклеокапсида), М (мембранный белок), Е (белок оболочки), S (спайк белок); и неструктурные белки nsp1-16, выполняющие различные функции.

SARS-CoV-2 мутирует с течением пандемии. Большинство мутаций не имеет никакого (значимого) влияния на свойства вируса, однако иногда они могут изменять способность вируса к распространению, тяжесть вызываемого заболевания и т.д. ВОЗ ведет мониторинг появления вариантов SARS-CoV-2 и классифицирует их по потенциалу влияния на систему здравоохранения ("Tracking SARS-CoV-2 variants", World Health Organization, <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>). На конец 2021 г. - начало 2022 г. вариантом, вызывающим озабоченность (VOC), является Omicron.

Актуальной проблемой исследователей в данной области остается оценка характера формирования иммунного ответа на заражение SARS-CoV-2 и вакцинацию, его зависимость от демографических и расовых характеристик, а также изменение иммунного статуса во времени. В частности, востребованы иммунологические методы оценки гуморального (антительного) ответа. В дополнение к качественному определению антител имеется потребность в количественном определении и дифференциальной диагностике антител (IgA, IgM, IgG), что позволяет получить более глубокие познания относительно характера текущих и прошлых инфекций (волн) и выработки иммунитета у людей.

Известно множество доступных исследователям коммерческих тест-систем, например Anti-SARS-CoV-2 Omicron ELISA (IgG) и Anti-SARS-CoV-2 RBD США (IgG) от EUROIMMUN, где последний тест является количественным; в обоих в качестве антигена используется фрагмент S1, полученный из белка S (<https://www.euroimmunblog.com/euroimmun-launches-two-assays-for-the-quantification-of-sars-cov-2-antibodies/>).

В целом, в уровне техники предлагаются различные антигенные последовательности индивидуальных структурных белков SARS-CoV-2 для применения в диагностических и терапевтических целях. Например, в WO2021226229 раскрываются различные иммуногенные варианты N и S белков SARS-CoV-2, а также их фрагменты, например домен RBD S белка.

Однако подобные решения имеют тот недостаток, что в случае необходимости задействовать в исследованиях различные структурные белки, специалист будет вынужден использовать панель антигенов, что ведет к снижению производительности работы и повышает количество ошибок.

В области вакцин против SARS-CoV-2 ведутся разработки полиэпитопных вакцин на основе пептидов, содержащих 2 и более коротких эпитопов или фрагментов белков SARS-CoV-2 (WO2022104002), однако успешное применение подобного подхода для диагностических антигенов, по-видимому, неизвестно.

Из WO2021216743 известны химерные антигены, содержащие определенные фрагменты S, N и M

белков SARS-CoV-2 для стимулирования Т-клеточного ответа (фиг. 7, SEQ ID NO: 24, 25), и которые могут рассматриваться в качестве прототипа настоящего изобретения. Вместе с тем, фрагмент S в составе указанных химер не включает RBD, и ни одна из химер не содержит эпитопы всех структурных белков SARS-CoV-2. Отсутствуют сведения о диагностической ценности раскрытых антигенов.

Настоящее изобретение преодолевает недостатки, присущие известным решениям, и решает проблему предоставления универсального гибридного антигена SARS-CoV-2 для исследовательских и диагностических целей.

Сущность изобретения

В одном аспекте изобретения предложен гибридный антигенный белок, содержащий каждую из аминокислотных последовательностей следующих фрагментов структурных белков штамма SARS-CoV-2 MN908947:

- a) полная последовательность N белка,
- b) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 6-20 E белка,
- c) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 129-143 M белка,
- e) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 345-360 S белка,
- f) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 500-520 S белка,
- и, необязательно, d) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 36-50 E белка; или последовательностей гомологичных фрагментов из штамма SARS-CoV-2, отличающегося от MN908947;

при этом белок характеризуется порядком b-c в направлении от N- к С-концу, а если присутствует фрагмент (d) - порядком b-c-d в направлении от N- к С-концу.

Кроме того, предложена нуклеиновая кислота, кодирующая указанный белок, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, а также клетка, содержащая указанную нуклеиновую кислоту или вектор.

В одном воплощении гибридный белок содержит все фрагменты (a)-(f); альтернативно, белок не содержит фрагмент (d).

В предпочтительных воплощениях штамм SARS-CoV-2, отличающийся от MN908947, выбран из следующих: OV054768, MZ433432, OM367886, OK091006, OM287553, MW514307.

В неограничивающих частных воплощениях указанный гибридный белок содержит одну или несколько из следующих последовательностей:

- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4 ("фрагмент N");
- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 или 6 ("фрагмент E1");
- последовательность SEQ ID NO: 7 ("фрагмент M");
- последовательность SEQ ID NO: 8 ("фрагмент E2");
- последовательность SEQ ID NO: 9 ("фрагмент S1");
- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 или 11 ("фрагмент S2").

Предпочтительно указанный гибридный белок имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 14, 15, 16, 17 или 18; предпочтительно состоит из нее.

В одном из частных воплощений указанный гибридный белок мечен детектируемой меткой, является иммобилизованным на субстрате и/или содержит последовательность, выбранную из His-tag, сайта распознавания протеазы, последовательности усиливающей иммунный ответ, или комбинации указанного.

Авторы изобретения обнаружили, что гибридный белок является эффективным антигеном, который несёт в себе антигенные детерминанты (эпитопы) всех структурных белков коронавируса SARS-CoV-2. Таким образом, обеспечен универсальный антиген, который может быть использован, в частности, для комплексных оценок иммунитета, где в ином случае понадобилось бы несколько отдельных коронавирусных белков.

Кроме этого, гибридный белок обеспечивает следующие преимущества и эффекты:

размер белка и его физико-химические свойства обеспечивают простоту его наработки и очистки; процесс производства белка является быстрым, к нему предъявляется минимум требований, в том числе потому, что инфекционный агент как таковой не используется при производстве;

белок не требует создания низкотемпературной холодильной цепи, может храниться при +4°C до 2 лет, а в лиофилизированной форме - гораздо дольше;

белок не содержит фрагменты, гомологичные фрагментам молекул организма;

вызывает как клеточный, так и антительный ответ.

Кроме того, изобретение также включает следующие объекты:

способ получения белка по изобретению, включающий наработку белка с помощью клетки по изобретению (которая содержит нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению), его выделение и, необязательно, очистку;

иммунологический способ определения наличия антител к SARS-CoV-2 в образце субъекта, включающий инкубацию этого образца с гибридным белком по изобретению и детекцию связывания гибридного белка с антителами (реакция антиген-антитело);

применение гибридного белка по изобретению в качестве антигена SARS-CoV-2;

набор для проведения иммунологического анализа, отличающийся тем, что в качестве антигена ис-

пользуется гибридный белок по изобретению;

конъюгат для применения в иммунологическом способе, включающий гибридный белок по изобретению и детектируемую метку.

Перечень графических материалов

Фиг. 1 - диаграмма, иллюстрирующая субпопуляционную структуру Т-лимфоцитов мышей исследованных групп согласно Примеру 3; вертикальная ось - количество живых Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ ; "контроль-" - отрицательный контроль, "опыт" - стимуляция белком по Примеру 1, "контроль+" - положительный контроль.

Фиг. 2 - карта вектора, с помощью которого получали белок по Примеру 1.

Описание последовательностей.

SEQ ID NO:	Описание
1	Белок из Примера 1
2	N полностью, MN908947
3	N полностью, MW514307
4	N полностью, OM287553
5	E1, позиции 6-20, MN908947, MW514307
6	E1, позиции 6-20 OM287553
7	M, позиции 129-143, MN908947, MW514307, OM287553
8	E2, позиции 36-50, MN908947, MW514307, OM287553
9	S1, позиции 345-360, MN908947, MW514307, OM287553
10	S2, позиции 500-520, MN908947, MW514307
11	S2, позиции 500-520, OM287553
12	Пример 1, вставка в вектор
13	pET24a_Nnew, Пример 1, полная последовательность
14	аналог на основе Дубровки
15	аналог на основе Омикрона
16	аналог без E2
17	аналог без E2 на основе Дубровки
18	аналог без E2 на основе Омикрона

Обозначения белков согласно GenBank:

- MN908947: E - QHD43418, M - QHD43419, S - QHD43416, N - QHD43423;
- MW514307: E - QQW55899, M - QQW55900, S - QQW55897, N - QQW55905;
- OM287553: E - UJD17631, M - UJD17632, S - UJD17629, N - UJD17637.

Подробное описание изобретения

Терминология.

Все используемые термины имеют значения, соответствующие принятым в данной области, если более специфическое или иное толкование не определено в данном документе и не следует из контекста.

Термины "пептид", "полипептид", "белок" относятся к полимеру из аминокислот независимо от длины полимера; таким образом, фрагменты белка, олигопептиды и белки включены в определение. Эти термины также охватывают постэкспрессионные модификации, например ковалентное присоединение гликозильных, ацетильных, фосфатных, липидных групп и т.п. В данное определение также включены полипептиды и белки, которые содержат один или более аналогов аминокислоты (включая, например, не встречающиеся в природе аминокислоты, аминокислоты, которые встречаются в природе только вне родственной биологической системы, модифицированные аминокислоты из систем млекопитающих и т.д.), полипептиды и белки с замещенными связями, а также другие модификации, известные в данной области, природные или не природные. Употребление этих терминов в контексте изобретения указывает на преимущественную природу вещества, но, как будет показано далее, не означает, что в полипептиде и белке присутствуют только и исключительно аминокислотные остатки.

Термины "химерный", "гибридный", "рекомбинантный" используются взаимозаменяемо в отношении белка по изобретению и обозначают, в общем, белок, который создан путем соединения частей (белков или их фрагментов), взятых из различных источников.

"Антигенный" указывает на функцию белка и определяет его назначение. В контексте изобретения этот термин подразумевает, что белок по изобретению обладает функцией антигена SARS-CoV-2.

"Вариант" означает, при ссылке на белок, полипептид, нуклеиновую кислоту и иные объекты, такие эквиваленты, которые имеют близкую аминокислотную или нуклеотидную последовательность и сохраняют желаемую структуру и/или функциональность. При ссылке на вирус термины "вариант", "штамм", "изолят" употребляются, как правило, взаимозаменяемо, однако следует понимать, что в рамках конкретной системы именования или классификации данные термины могут иметь иное или более точное значение, характерные для этих систем; например, "вариант", "штамм" или "изолят" могут означать индивидуальный геном или группу близких по структуре геномов. В любом случае, поскольку изобретение не ограничено в отношении используемых вариантов, штаммов, изолятов, данные термины следует толковать расширительно, если контекст прямо не указывает иное.

"Процент идентичности" характеризует вариант ("идентичная последовательность"), сходный на определенное этим процентом количество остатков аминокислот со сравниваемой последовательностью. Например, идентичность на 80% какой-либо другой последовательности означает 80% совпадающих аминокислот в том же положении при выравнивании последовательностей, которое можно осуществить известными в данной области техники способами. Аналогично этот термин применяется и к нуклеиновым кислотам, где сравнивается количество.

"Мутации" означают, в контексте белка или нуклеиновой кислоты, точечные замены аминокислотных остатков и нуклеиновых оснований, инсерции и делеции остатков и оснований (в случае оснований со сдвигом рамки считывания или без сдвига).

Под "антигенами" понимают молекулу или молекулярную структуру, распознаваемую рецептором антигена, например антителами или их фрагментами, Т-клеточными рецепторами и прочими связывающими структурами. Антигены содержат один или несколько эпитопов - характерных структурных признаков антигена (антигенные детерминанты). Антиген может представлять собой иммуноген, т.е. способен вызывать гуморальный или клеточный иммунитет.

"Иммунологический анализ" представляет собой биохимический тест, в котором измеряют присутствие или концентрацию аналита (как правило, но необязательно, это белок) с помощью связывающей молекулы (например, антитела) или антигена.

При использовании терминов в единственном числе подразумевается, там, где допускает контекст, что возможно и множественное число, и наоборот.

Термины "включающий", "содержащий", "имеющий" и т.п. означают, что помимо указанных элементов могут содержаться иные неоговоренные (несущественные) элементы. В каждом случае данные термины также охватывают значение "состоящий из", т.е. в одном из воплощений подразумевают, что описываемый объект характеризуется наличием только указанных элементов.

Упомянутые численные значения подразумевают как ровно указанное значение, так и примерно соответствующее ему (для этого также используются термины "около", "примерно", "приблизительно"), что определяется отклонением в большую и/или меньшую сторону на 10, 5, 2 или 1%, или, в случае параметров, которые могут быть измерены с определенной точностью, - в пределах ошибки измерений, характерной для традиционных средств измерения.

Приводимые интервалы по умолчанию подразумевают, что непосредственно раскрыты как граничные значения интервалов, так и все содержащиеся в интервале значения.

Способы и методы биоинженерии по настоящему изобретению обычно осуществляют в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. См., например,

Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); и Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003).

Ссылки на аминокислотные остатки, использованные в настоящей заявке, обозначены общепринятым однобуквенным или трехбуквенным кодом (см., например, Lehninger, *Biochemistry*, 2nd edition, Worth Publishers, New York, 1975, p. 72).

Структура белка.

Гибридный антигенный белок по изобретению содержит пять-шесть фрагментов, полученных из структурных белков SARS-CoV-2:

- а) полноразмерный N белок ("фрагмент N"),
- б) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 6-20 E белка ("фрагмент E1"),
- с) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 129-143 M белка ("фрагмент M"), необязательно

- d) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 36-50 E белка ("фрагмент E2"),
 e) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 345-360 S белка ("фрагмент S1"),
 f) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 500-520 S белка ("фрагмент S2").

В гибридном белке необходимо соблюдать порядок расположения фрагментов b-c (или E1-M) в направлении от N- к С-концу, а если присутствует фрагмент (d), то порядок b-c-d (или E1-M-E2) в направлении от N- к С-концу. Остальные фрагменты могут располагаться в различном порядке от N- к С-концу, например

N-E1-M-E2-S1-S2, N-E1-M-E2-S2-S1, S1-E1-M-E2-S2-N, S1-E1-M-E2-N-S2, S2-E1-M-E2-S1-N, S2-E1-M-E2-N-S1, E1-M-E2-S1-S2-N, E1-M-E2-N-S1-S2, E1-M-E2-S1-N-S2, E1-M-E2-S2-N-S1, E1-M-E2-S2-S1-N, E1-M-E2-N-S2-S1, S1-N-E1-M-E2-S2, N-S1-E1-M-E2-S2, S2-N-E1-M-E2-S1, N-S2-E1-M-E2-S1, S1-S2-E1-M-E2-N, S2-S1-E1-M-E2-N, S1-S2-N-E1-M-E2, S2-S1-N-E1-M-E2, N-S1-S2-E1-M-E2, N-S2-S1-E1-M-E2, S1-N-S2-E1-M-E2, S2-N-S1-E1-M-E2, N-E1-M-S1-S2, N-E1-M-S2-S1, S1-E1-M-S2-N, S1-E1-M-N-S2, S2-E1-M-S1-N, S2-E1-M-N-S1, E1-M-S1-S2-N, E1-M-N-S1-S2, E1-M-S1-N-S2, E1-M-S2-N-S1, E1-M-S2-S1-N, E1-M-N-S2-S1, S1-N-E1-M-S2, N-S1-E1-M-S2, S2-N-E1-M-S1, N-S2-E1-M-S1, S1-S2-E1-M-N, S2-S1-E1-M-N, S1-S2-N-E1-M, S2-S1-N-E1-M, N-S1-S2-E1-M, N-S2-S1-E1-M, S1-N-S2-E1-M или S2-N-S1-E1-M.

Выражение "последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам" следует понимать, как последовательность, которая непосредственно представлена указанными остатками в штамме дикого типа (MN908947), а в случае использования иного штамма - гомологичная последовательность, которую можно установить путем выравнивания аминокислотной последовательности соответствующего белка указанного иного штамма относительно аминокислотной последовательности этого же белка в штамме дикого типа. Выравнивание может быть выполнено с помощью известных алгоритмов (например, BLAST, PSI-BLAST, FASTA) или вручную. Для многих штаммов указанные позиции (6-20 и 36-50 E белка, 129-143 M белка, 345-360 и 500-520 S белка) будут гомологичными таковым в штамме дикого типа. Для тех штаммов, в аминокислотных последовательностях белков которых имеются делеции (выпадения) или инсерции (вставки) со стороны N-конца перед соответствующим фрагментом, нумерация позиций, указанных для штамма дикого типа, будет изменена на соответствующее количество выпадающих или вставленных аминокислотных остатков. Если делеция или инсерция находится внутри интересующего фрагмента, то в гибридный белок по изобретению включают, соответственно, укороченную или увеличенную последовательность.

Гомология фрагментов, с учетом природной вариабельности вируса, может сохраняться при идентичности последовательности по меньшей мере 90% для фрагмента N, по меньшей мере 85% для фрагмента S2, по меньшей мере 80% для фрагментов E1, M, E2, S1. Таким образом, в альтернативных воплощениях гибридный белок по изобретению может характеризоваться одним или несколькими из указанных признаков:

- a) белок содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 и 4, или последовательность, идентичную ей на 90%, в частности на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%;
 b) белок содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и 6, или последовательность, идентичную ей на 80%, в частности на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%;
 c) белок содержит последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, идентичную ей на 80%, в частности на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%;
 d) белок содержит последовательность SEQ ID NO: 8 или последовательность, идентичную ей на 80%, в частности на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%;
 e) белок содержит последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, идентичную ей на 80%, в частности на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%;
 f) белок содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 и 11, или последовательность, идентичную ей на 85%, в частности на 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В альтернативном воплощении белок по изобретению может включать последовательность SEQ ID NO: 1, 14, 15, 16, 17 или 18, или последовательность, идентичную ей на 80%, в частности на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Штаммы.

Изобретение не ограничено конкретными штаммами или вариантами SARS-CoV-2, на основе которых может быть получен гибридный белок по изобретению.

Все фрагменты N, E1, M, E2, S1, S2 могут быть получены из одного штамма SARS-CoV-2. В альтернативном воплощении один или несколько фрагментов могут быть получены из одного штамма SARS-CoV-2, а остальные - из другого (других) штамма.

Существуют различные системы классификации штаммов, в том числе GISAID, Nextstrain и Pango. ВОЗ дополнительно ввело обозначение некоторых вариантов коронавируса буквами греческого алфавита; на конец 2021 г. обозначены следующие варианты: Альфа, Бета, Гамма, Дельта, Эпсилон, Дзета, Эта, Тета, Йота, Каппа, Лямбда, Мю, Омикрон. Среди них ВОЗ выделяет варианты, вызывающие озабоченность (VOC) и интерес (VOI), а также варианты, подлежащие мониторингу (VUM, VOC-LUM; <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>). На 9 марта 2022 г. в списке VOC содержится только Омикрон, а список VOI пуст. Следует понимать, что под "вариантами" с точки зрения классификации ВОЗ и Pango понимается группа близкородственных вирусов, имеющих общего предка (lineage, sublineage). В классификации GISAID и Nextstrain используется термин "клада".

С точки зрения изобретения может быть предпочтительным использование текущих вариантов VOC, VOI и VUM для создания гибридного белка, однако могут быть использованы и варианты, исключенные из списков VOC, VOI и VUM.

Варианты классифицируют, как правило, по совокупности характерных мутаций, включающих синонимичные и несинонимичные, где последние означают изменение аминокислотной последовательности. Сведения о характерных мутациях в вариантах SARS-CoV-2 могут быть получены в базе CoVariants (Emma B. Hodcroft. 2021. "CoVariants: SARS-CoV-2 Mutations and Variants of Interest." <https://covariants.org/>).

В качестве примера фрагменты белка по изобретению могут быть получены из следующих штаммов, согласно обозначениям GenBank: MN908947 (первоначально описанный штамм SARS-CoV2 "WH-Human 1" или "2019-nCoV" или "дикий тип"; NCBI Reference Sequence: NC_045512.2), MW514307 ("Дубровка"), OM287553 ("Омикрон"), OK091006 ("Дельта"), OM367886 ("Гамма"), OV054768 ("Альфа"), MZ433432 ("Бета") не ограничиваясь указанным; предпочтительно, штаммы выбраны из MN908947, MW514307 и OM287553.

В альтернативных воплощениях фрагменты белка по изобретению могут быть получены из следующих вариантов SARS-CoV-2 согласно классификации Pango: A.1, A.2,

A.2.2-A.2.5, A.2.5.1-A.2.5.3, A.3-A.23, A.23.1, A.24-A.30, B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, C.1, C.1.1, C.1.2, C.2, C.2.1, C.3-C.36, C.36.1-C.36.3, C.36.3.1, C.37, C.37.1, C.38-C.40, B.1.1.3-B.1.1.5, B.1.1.7, Q.1-Q.8, B.1.1.8, B.1.1.10, L.1-L.4, B.1.1.12-B.1.1.17, B.1.1.25, D.2-D.5, B.1.1.26-B.1.1.28, P.1, P.1.1-P.1.7, P.1.7.1, P.1.8-P.1.10, P.1.10.1, P.1.10.2, P.1.11, P.1.12, P.1.12.1, P.1.13-P.1.17, P.1.17.1, P.2-P.7, B.1.1.29-B.1.1.31, B.1.1.33, N.1-N.10, B.1.1.34, B.1.1.37-B.1.1.39, AQ.1, AQ.2, B.1.1.40, B.1.1.41, B.1.1.43-B.1.1.59, B.1.1.61-B.1.1.63, B.1.1.67, B.1.1.70, AP.1, B.1.1.71, B.1.1.72, B.1.1.74, B.1.1.75, B.1.1.77, B.1.1.82-B.1.1.84, B.1.1.86-B.1.1.93, B.1.1.95, B.1.1.97-B.1.1.101, B.1.1.107, B.1.1.109-B.1.1.123, B.1.1.125, B.1.1.127-B.1.1.130, B.1.1.132-B.1.1.139, B.1.1.141, B.1.1.142, B.1.1.144, B.1.1.145, B.1.1.147-B.1.1.149, B.1.1.152-B.1.1.155, B.1.1.157-B.1.1.166, B.1.1.168-B.1.1.172, B.1.1.174-B.1.1.178, B.1.1.180-B.1.1.182, B.1.1.184-B.1.1.187, B.1.1.189-B.1.1.194, B.1.1.196-B.1.1.198, B.1.1.200, AN.1, B.1.1.201-B.1.1.205, B.1.1.207-B.1.1.210, B.1.1.213, B.1.1.214, B.1.1.216, AM.1-AM.4, B.1.1.217, S.1, B.1.1.218-B.1.1.222, B.1.1.224-B.1.1.228, B.1.1.231, AL.1, B.1.1.232, AK.1, AK.2, B.1.1.234, B.1.1.236, B.1.1.237, B.1.1.239, B.1.1.241, AH.1-AH.3, B.1.1.240, AJ.1, B.1.1.242-B.1.1.244, B.1.1.249, B.1.1.251, B.1.1.253-B.1.1.258, B.1.1.261, B.1.1.262, B.1.1.263, B.1.1.265, B.1.1.266, B.1.1.267, B.1.1.268, B.1.1.269, B.1.1.270, B.1.1.271,

B.1.1.272, B.1.1.273, B.1.1.274, B.1.1.275, B.1.1.277, K.1, K.2, K.3, B.1.1.279, B.1.1.280,
 B.1.1.282, B.1.1.283, B.1.1.284, B.1.1.285, B.1.1.286, B.1.1.288, B.1.1.289, B.1.1.290,
 B.1.1.291, B.1.1.294, M.1, M.2, M.3, B.1.1.296, B.1.1.297, AG.1, B.1.1.298, B.1.1.299,
 B.1.1.300, B.1.1.301, B.1.1.302, B.1.1.303, B.1.1.304, B.1.1.305, AF.1, B.1.1.306, AE.1, AE.2,
 AE.3, AE.4, AE.5, AE.6, AE.7, AE.8, B.1.1.307, B.1.1.308, B.1.1.309, B.1.1.310, B.1.1.311,
 B.1.1.312, B.1.1.315, AD.1, AD.2, AD.2.1, B.1.1.316, R.1, R.2, B.1.1.317, AS.1, AS.2,
 B.1.1.318, AZ.1, AZ.2, AZ.2.1, AZ.3-AZ.6, B.1.1.319, B.1.1.320, B.1.1.322-B.1.1.370, AT.1,
 B.1.1.371-B.1.1.389, B.1.1.391-B.1.1.442, B.1.1.444-B.1.1.453, B.1.1.456, B.1.1.458,
 B.1.1.459, B.1.1.461-B.1.1.464, AW.1, B.1.1.465-B.1.1.467, B.1.1.480-B.1.1.482, AV.1,
 B.1.1.483-B.1.1.487, B.1.1.500, B.1.1.506, B.1.1.507, B.1.1.512-B.1.1.519, B.1.1.521-
 B.1.1.526, B.1.1.528, B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.1.1.1, BC.1, BC.2, BA.1.1.2-BA.1.1.18,
 BA.1.2-BA.1.10, BA.1.12, BA.1.13, BA.1.13.1, BA.1.14, BA.1.14.1, BA.1.14.2, BA.1.15,
 BA.1.15.1-BA.1.15.3, BA.1.16, BA.1.16.1, BA.1.16.2, BA.1.17, BA.1.17.1, BA.1.17.2, BD.1,
 BA.1.18-BA.1.20, BA.1.21, BA.1.21.1, BA.1.22-BA.1.24, BA.2, BA.2.1, BA.2.2, BA.2.2.1,
 BA.2.3, BA.2.3.1-BA.2.3.18, BA.2.4-BA.2.9, BA.2.9.1-BA.2.9.5, BA.2.10, BA.2.10.1-
 BA.2.10.3, BA.2.11, BA.2.12, BA.2.12.1, BG.1-BG.4, BA.2.12.2, BA.2.13, BA.2.13.1,
 BA.2.14-BA.2.23, BA.2.23.1, BA.2.24, BA.2.25, BA.2.25.1, BA.2.26-BA.2.38, BA.2.38.1,
 BA.2.39, BA.2.40, BA.2.40.1, BA.2.41-BA.2.56, BA.2.56.1, BA.2.57-BA.2.77, BA.2.80,
 BA.2.81, BA.3, BA.3.1, BA.4, BA.4.1, BA.4.1.1-BA.4.1.3, BA.4.1.4, BA.4.2-BA.4.7, BA.5,
 BA.5.1, BA.5.1.1-BA.5.1.4, BA.5.2, BA.5.2.1, BF.1, BF.1.1, BF.2-BF.5, BA.5.2.2-BA.5.2.4,
 BA.5.3, BA.5.3.1, BE.1, BE.1.1, BE.2, BE.3, BA.5.3.2-BA.5.3.4, BA.5.5, BA.5.6, BB.2, B.1.2,
 B.1.3, B.1.6, B.1.8, B.1.12-B.1.14, B.1.22, B.1.22.1, B.1.23, B.1.35, B.1.36, B.1.36.1, B.1.36.2,
 B.1.36.7-B.1.36.10, B.1.36.12, B.1.36.16-B.1.36.29, B.1.36.31, B.1.36.33-B.1.36.39, B.1.37-
 B.1.40, B.1.44, B.1.67, B.1.69, B.1.70, B.1.76, B.1.77, B.1.78, B.1.81, B.1.83, B.1.84, B.1.91,
 B.1.93, B.1.94, B.1.96, B.1.97, B.1.103-B.1.106, B.1.108, B.1.110, B.1.110.1-B.1.110.3,
 B.1.111-B.1.113, B.1.115-B.1.120, B.1.124, B.1.126-B.1.128, B.1.131, B.1.134, B.1.137,
 B.1.139, B.1.140, B.1.142, B.1.143, B.1.145-B.1.147, B.1.149, B.1.151, B.1.153, B.1.157-
 B.1.160, B.1.160.7-B.1.160.16, AB.1, B.1.160.17-B.1.160.33, B.1.161-B.1.170, B.1.173,
 B.1.177, B.1.177.2-B.1.177.12, B.1.177.14, B.1.177.15, AA.1- AA.8, B.1.177.16-B.1.177.21,
 B.1.177.23-B.1.177.89, Z.1, Y.1, W.1, W.2, W.3, W.4, V.1, V.2, U.1, U.2, U.3, B.1.178-
 B.1.182, B.1.184, B.1.187-B.1.192, B.1.194, B.1.195, B.1.198, B.1.199, B.1.201, B.1.203,
 B.1.206, B.1.205, B.1.208, B.1.210-B.1.214, B.1.214.1-B.1.214.4, B.1.215, B.1.218-B.1.221,
 B.1.221.1-B.1.221.4, B.1.222-B.1.225, B.1.227, B.1.229, B.1.231-B.1.240, B.1.240.1, B.1.240.2,
 B.1.241, B.1.243, B.1.243.1, B.1.243.2, B.1.242, B.1.245, B.1.247-B.1.252, B.1.254, B.1.256,
 B.1.258, B.1.258.2, G.1, B.1.258.3-B.1.258.7, B.1.258.9-B.1.258.12, B.1.258.14-B.1.258.24,

B.1.260, B.1.263, B.1.264, B.1.264.1, B.1.265, B.1.267, B.1.268, B.1.270, B.1.273, B.1.274, B.1.276, B.1.277, B.1.279, B.1.280-B.1.282, B.1.284, B.1.285, B.1.287, B.1.289, B.1.291-B.1.294, B.1.298, B.1.301, B.1.302, B.1.304-B.1.306, B.1.308-B.1.311, B.1.313-B.1.316, B.1.318-B.1.321, B.1.323-B.1.326, B.1.328-B.1.330, B.1.332-B.1.338, B.1.340-B.1.342, B.1.344, B.1.346, B.1.348-B.1.350, B.1.350.1, B.1.351, B.1.351.1-B.1.351.3, B.1.351.5, B.1.343, B.1.354-B.1.362, B.1.362.1, B.1.362.2, B.1.363, B.1.366, B.1.367, B.1.369, B.1.369.1, B.1.370-B.1.372, B.1.375, B.1.377-B.1.385, B.1.387-B.1.391, B.1.393, B.1.395-B.1.400, B.1.400.1, B.1.401-B.1.409, B.1.411, B.1.413, B.1.415, B.1.415.1, B.1.416, B.1.416.1, B.1.417, B.1.418, B.1.420-B.1.428, B.1.428.1-B.1.428.3, B.1.429, B.1.429.1, B.1.431-B.1.438, B.1.438.1-B.1.438.4, B.1.439, B.1.441-B.1.446, B.1.448, B.1.450-B.1.453, B.1.456, B.1.458-B.1.460, B.1.462, B.1.463, B.1.465, B.1.466, B.1.466.1, B.1.466.2, AU.1-AU.3, B.1.467-B.1.471, B.1.473-B.1.476, B.1.478-B.1.480, B.1.482, B.1.483, B.1.485-B.1.499, B.1.499.1, B.1.500-B.1.511, B.1.513, B.1.515-B.1.517, B.1.517.1, B.1.518, B.1.520, B.1.521, B.1.523-B.1.552, B.1.554-B.1.564, B.1.564.1, B.1.565-B.1.575, B.1.575.1, B.1.575.2, B.1.576-B.1.582, B.1.585-B.1.588, B.1.588.1, B.1.589-B.1.595, B.1.595.1-B.1.595.4, B.1.596, B.1.596.1, B.1.597-B.1.607, B.1.609-B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, AY.1-AY.3, AY.3.1-AY.3.4, AY.4, AY.4.1, AY.4.2, AY.4.2.1-AY.4.2.5, AY.4.3-AY.4.17, AY.5, AY.5.1-AY.5.7, AY.6, AY.7, AY.7.1, AY.7.2, AY.8, AY.9, AY.9.2, AY.9.2.1, AY.9.2.2, AY.10, AY.11, AY.13-AY.16, AY.16.1, AY.17-AY.20, AY.20.1, AY.21-AY.23, AY.23.1, AY.23.2, AY.24, AY.24.1, AY.25, AY.25.1, AY.25.1.1, AY.25.1.2, AY.25.2, AY.25.3, AY.26, AY.26.1, AY.27-AY.29, AY.29.1, AY.29.2, AY.30-AY.33, AY.33.1, AY.33.2, AY.34, AY.34.1, AY.34.1.1, AY.34.2, AY.35, AY.36, AY.36.1, AY.37-AY.39, AY.39.1, AY.39.1.1-AY.39.1.4, AY.39.2-AY.39.4, AY.40-AY.42, AY.42.1, AY.43, AY.43.1-AY.43.9, AY.44-AY.46, AY.46.1-AY.46.6, AY.46.6.1, AY.47-AY.75, AY.75.2, AY.75.3, AY.76-AY.88, AY.90, AY.91, AY.91.1, AY.92, AY.93-AY.95, AY.98, AY.98.1, AY.98.1.1, AY.99, AY.99.1, AY.99.2, AY.100-AY.102, AY.102.1, AY.102.2, AY.103, AY.103.1, AY.103.2, AY.104-AY.112, AY.112.1-AY.112.3, AY.113, AY.114, AY.116, AY.116.1, AY.117-AY.119, AY.119.1, AY.119.2, AY.120, AY.120.1, AY.120.2, AY.120.2.1, AY.121, AY.121.1, AY.122, AY.122.1-AY.122.6, AY.123, AY.123.1, AY.124, AY.124.1, AY.124.1.1, AY.125, AY.125.1, AY.126, AY.127, AY.127.1-AY.127.3, AY.128-AY.134, B.1.617.3, B.1.618, B.1.619, B.1.619.1, B.1.620, B.1.621, B.1.621.1, B.1.621.2, B.1.622, B.1.623, B.1.625-B.1.627, B.1.629-B.1.637, B.1.637.1, B.1.638-B.1.640, B.1.640.1, B.1.640.2, B.1.641, B.1.9, B.1.9.1-B.1.9.5, B.3, B.3.1, B.4, B.4.1-B.4.8, B.5, B.6, B.6.1-B.6.6, B.6.8, B.10-B.13, B.15, B.18-B.20, B.23, B.26-B.53, B.55-B.58, B.60, B.61, XA, XB, XC, XD, XE, XF, XG, XH, XI, XK, XL, XM, XN, XP, XQ, XR, XS, XT, XU, XV, XW, XY, XZ, XAA, XAB, XAC, XAD, XAE, XAF, XAG, XAH.

Гибридный белок по изобретению может быть получен на основе как природных последовательностей, так и рекомбинантных.

В одном воплощении фрагменты гибридного белка по изобретению могут быть получены из белков, имеющих любую одну или несколько из указанных мутаций:

- S: R346K, N501Y, Y505H;

- N: S2-, D3L, D3Y, A12G, P13L, E31-, R32-, S33-, D63G, P67S, P80R, P151S, S186Y, P199L, R203K, R203M, G204R, T205I, G214C, G215C, A220V, M234I, S235F, A376T, D377Y, S413R;

- E: T9I;

в частности, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из указанных мутаций. Указанные мутации могут затрагивать только фрагмент S, только фрагмент N, только фрагмент E или любую комбинацию указанного.

Вышеуказанные мутации могут исходно присутствовать в белках, когда речь идет о встречающихся

в природе вариантах вируса, или могут быть намеренно внесены с получением рекомбинантных белков. Способы введения мутаций в аминокислотные последовательности белка хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)). В последовательность белка могут быть внесены иные замены, при которых сохраняется функция белка. В частности, могут быть произведены консервативные замены, как известно специалистам, например с помощью матриц замен аминокислот, таких как PAM, JTT, BLOSUM (например, BLOSUM62).

Изобретение не ограничено теми штаммами и вариантами SARS-CoV-2, которые описаны на дату создания изобретения, и может быть успешно реализовано с иными, которые будут неизбежно образовываться в процессе эволюции.

Различные воплощения модификации белка.

Гибридный белок по изобретению может представлять собой изолированный белок, т.е. представлять собой отдельную молекулу, или быть частью другой молекулы, например частью белка или конъюгата.

В одном из воплощений изобретения гибридный белок может быть конъюгирован с другой молекулой, например, для увеличения растворимости, для предотвращения или уменьшения протеолиза, для возможности детекции и т.д. Группы, молекулы, фрагменты, упоминаемые в данном описании, могут быть присоединены с С- или N-конца белка по изобретению или к аминокислотному остатку внутри последовательности белка по изобретению.

Молекулы, которые могут быть конъюгированы с гибридным белком по изобретению, включают без ограничений, биотин, полиэтиленгликоль, нуклеиновые кислоты, полисахариды и белки других организмов. Конъюгация может быть прямой или опосредованной (например, через линкер). Использование биотина, который прочно связывается с авидином и стрептавидином, может быть полезно для выделения и/или очистки белка; биотин может быть прикреплен к N-концу или боковой цепи остатка лизина или глутаминовой кислоты, как известно специалистам.

В состав белка, с N- или С-конца или внутри последовательности белка, могут входить дополнительные функциональные последовательности, например пептидные тэги (tags), предназначенные для изменения растворимости (например повышения), для очистки или иммобилизации белка (в частности, аффинные тэги), сигнальные пептиды, например для транспорта пептида в определенное положение в клетке-продуценте или вне ее, для визуализации/отслеживания белка. Как правило, пептидные тэги являются короткими последовательностями, однако в некоторых случаях могут представлять собой целые белки, например ферменты. Не ограничиваясь указанным, в состав белка могут входить следующие тэги: His-tag (6-8 остатков гистидина), Myc tag (EQKLISEEDL), V5 tag (GKPIPNPLLGLDST), GST (глутатион-S-трансфераза), Arg tag (5-6 остатков аргинина), FLAG-tag (DYKDDDDK или DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK), HA (YPYDVPDYA), стрептавидин-связывающий пептид, Strep-tag, Strep-tag II (WSHPQFEK), Twin-Strep Tag, и прочее. Дополнительные сведения относительно пептидных тэгов и нюансов их использования в гибридных белках хорошо известны специалистам (Wood DW (2014) *New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification*. *Curr Opin Struct Biol* 26: 54-61; Pina AS, et al. (2014) *Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: An overview*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1129: 147-168; Xi Han, Wenbo Ning, Xiaoqiang Ma, Xiaonan Wang, Kang Zhou. *Improving protein solubility and activity by introducing small peptide tags designed with machine learning models*. *Metabolic Engineering Communications*, Volume 11, 2020, e00138).

После очистки пептидные теги удаляют известными способами, например с помощью протеаз. К последовательности белка могут быть добавлены самоотщепляемые тэги; в частности, в комбинации с подходящим аффинным тэгом они обеспечивают очистку, расщепление и отделение требуемого белка в одну стадию.

Фрагменты в составе белка могут быть соединены непосредственно (встык) или посредством других аминокислотных последовательностей - линкеров (спейсеров). Такие последовательности хорошо известны специалистам (см., например, Chen X. et al. *Fusion protein linkers: Property, design and functionality*. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 65, Issue 10, 15 October 2013, PP. 1357-1369). Типично, линкер составляет от 3 до 35 аминокислотных остатков в длину, например 3-16, в частности 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. Неограничивающие примеры линкеров включают (GGGS)_n, (GGGGS)_n, GSAG-SAAGSGEF, EAAAK, AAY, GPMPG. Кроме того, могут быть добавлены нефункциональные спейсеры длиной в 1 или 2 аминокислотных остатков. В одном воплощении один или несколько из фрагментов S1, S2, N, E1, M, E2 фланкирован линкерами с обеих сторон (т.е., возможно, что между смежными фрагментами находятся два линкера, в этом случае они являются предпочтительно различными).

Предпочтительно, в блоке E1-M и, если присутствует фрагмент E2, в блоке E1-M-E2 фрагменты соединены встык. Между каждым из фрагментов S1, S2, N и блоком E1-M или E1-M-E2 присутствуют линкеры (например, AAY или GPMPG).

В белок могут быть включены сайты расщепления протеазами. В частности, такие сайты могут находиться между фрагментами, если, например, требуется произвести разделение эпитопов с получением

комбинации антигенных пептидов. Такие сайты могут находиться в иных местах, например для удаления меток или пептидных тэгов. Примером протеазы, подходящей для таких целей, является, без ограничения, TEV-протеаза, сайтом расщепления для которой является ENLYFQ|S, где | - место расщепления.

В белок по изобретению могут быть включены последовательности, обладающие свойствами адьювантов (внутрибелковые адьюванты, иммуномодуляторы), т.е. усиливающие иммунный ответ, с образованием "самоадьювирующей" конструкции. Как правило, такие внутрибелковые адьюванты представляют собой короткие пептиды. В качестве неограничивающего примера можно указать β -дефензины, например GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKKEEQIGKCSRGRKCCRRKK. Другие примеры включают HDP (host defence peptides), а также их более эффективные синтетические аналоги - IDR-пептиды (Innate defense regulator). Дополнительные сведения о внутрибелковых адьювантах известны специалистам (см., например, Tian, Y., Hu, Q., Zhang, R. et al. Rational design of innate defense regulator peptides as tumor vaccine adjuvants, *npj Vaccines* 6, 75 (2021)).

Белок по изобретению может содержать детектируемые метки, например радиоизотопы, ферменты, флуорофоры, что является полезным или даже обязательным для некоторых иммунологических тестов. В зависимости от сигнала его детектируют с помощью, например, радиометрии, колориметрии, флуориметрии, хемолюминесценции, нефелометрии. Типичной ферментной меткой в иммуноферментных анализах является пероксидаза хрена (HRP), субстратом для которой является, например, 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМВ).

Примеры флуоресцентных меток для использования совместно с белком по изобретению включают DyLight (например, DyLight-680, -750, -800), VivoTag (например, VivoTag-680, -750), BODIPY (например, BODIPY FL, R6G, TMR, TR, 530/550, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650, 650/665 и т.д.), IRDyes (например, IRD40, 700, 800 и т.д.), Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, ZQ800, ICG, акрадиновый оранжевый или желтый, Alexa Fluors (например, Alexa Fluor 790, 750, 700, 680, 660, 647, R 633, 594, 568, 546, 532, 488, 350), Oregon Green (например, Oregon Green 488, 500, 514 и др.), Texas Red, Texas Red-X, Spectrum Red, Spectrum Green, родаминовые красители (например, карбокситетраметил-родамин или TAMRA, карбоксиродамин 6G, карбокси-X-родамин (ROX), лиссамин родамин В, родамин 6G, родамин зеленый, родамин красный, тетраметилродамин (TMR) и т.д.), люциферин и любые другие известные метки.

Гибридный белок по изобретению может быть химически модифицирован для того, чтобы изменить (увеличить или уменьшить) или придать способность к обнаружению, определенный заряд, гидрофильность или гидрофобность, возможность конъюгировать с другими молекулами, определенный pH и т.д. Примером химической модификации может служить N-метилирование; соответственно, изобретение включает и метилированные варианты белка, не ограничиваясь этой модификацией.

Способ получения.

Гибридный белок по изобретению может быть получен стандартными микробиологическими способами получения рекомбинантных белков, известными специалистам (Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in microbial systems. *Front Microbiol.* 2014 Jul 8;5:341).

Специалистам известны ограничения тех или иных экспрессионных систем, поэтому под конкретный состав (размер) гибридного белка по изобретению подбирается подходящая система (вектор, клетка). Преимущество белка по изобретению состоит в том, что его размер в базовом воплощении позволяет легко получать его в различных экспрессионных системах. В частности, белки более приблизительно 100 кДа сложно или невозможно экспрессировать в наиболее простых системах - бактериальных. Обладая последовательностью приблизительно в 483 аминокислоты в одном из коротких вариантов, белок по изобретению подходит для экспрессии в бактериальной системе, причем остается достаточный запас для включения дополнительных последовательностей, описанных здесь, без выхода за обозначенный лимит. Таким образом, белок по изобретению предпочтительно обладает массой равной или менее 100 кДа, предпочтительно 95 кДа или менее, 90 кДа или менее, 85 кДа или менее, 80 кДа или менее, 75 кДа или менее, 70 кДа или менее, 65 кДа или менее, 60 кДа или менее, 55 кДа или менее, или приблизительно 54 кДа или менее. Вместе с тем, белок по изобретению, безусловно, может быть получен в других системах экспрессии, подходящих для более крупных белков, и его масса может превышать 100 кДа.

Белок по изобретению может быть иммобилизован на субстрате. Изобретение принципиально не ограничено в том, на каких субстратах и с помощью каких методик иммобилизован белок. Наиболее часто встречающийся вариант иммобилизации, применяемый в иммунологических анализах, - на поверхности лунок пластикового (полистирол или иной полимер) планшета или стрипа. В случае иммунохроматографических анализов белок по изобретению иммобилизуют на нитроцеллюлозной мембране тест-полоски. В общем, материалы для иммобилизации включают стекло, кремний-органические материалы, металлы, пластики, бумагу, различные полимеры, полимерные гели (агарозные, целлюлозные, полиакриламидные, декстрановые и т.д.). В некоторых вариантах изобретения белок присоединяют ковалентной связью, однако в других случаях это может быть необязательно, и фиксацию достигают за счет физической адсорбции, удержания в нанесенном на субстрат гидрогеле, различных аффинных взаимодействий. Методики иммобилизации хорошо известны специалистам в данной области (см., например *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Chapter 13 The immobilization of immunoreactants on

solid phases, Editor(s): P. Tijssen, Elsevier, V. 15, 1985, pp. 297-328; Dohyun Kim and Amy E. Herr, "Protein immobilization techniques for microfluidic assays", *Biomicrofluidics* 7, 041501 (2013); Nakanishi, Kazuhiro & Sakiyama, Takaharu & Kumada, Yoichi & Imamura, Koreyoshi & Imanaka, Hiroyuki. (2008). Recent Advances in Controlled Immobilization of Proteins onto the Surface of the Solid Substrate and Its Possible Application to Proteomics. *Current Proteomics -CURR PROTEOMICS*. 5). Соответственно, белок по изобретению также охватывает те воплощения, в которых он включает функциональную группу, расположенную на С- или N-конце или на одном из аминокислотных остатков внутри своей последовательности, и которая способна образовывать ковалентную связь с соответствующей группой на субстрате; а также воплощения в которых он включает фрагмент белковой или небелковой природы, позволяющий удерживать белок на субстрате за счет аффинных взаимодействий с соответствующими фрагментами белковой или небелковой природы, присутствующими на субстрате.

В одном из неограничивающих воплощений белок по изобретению конъюгирован с наночастицей коллоидного золота (например, 40 нм) или другого металла или неметаллической наночастицей.

Белок по изобретению может быть получен в виде концентрированного или разбавленного (готового к непосредственному применению) водного раствора, содержащего гибридный белок по изобретению в необходимой концентрации и, необязательно, буфер, например карбонат-бикарбонатный буфер или PBS (фосфатный буфер). В растворе могут содержаться иные дополнительные ингредиенты, полезные с точки зрения специалиста; например, раствор может представлять собой премикс для применения в иммунологическом анализе.

Альтернативно, белок по изобретению может быть получен в виде лиофилизованного препарата. Методы лиофилизации и применяемые вспомогательные вещества хорошо известны специалистам в данной области (С. Challener, "For Lyophilization, Excipients Really Do Matter," *BioPharm International* 30 (1) 2017).

Информация о геноме SARS-CoV-2 общедоступна и может быть получена, например, из базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации), относящейся к SARS-CoV-2 (<https://ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>) и NGDC (<https://ngdc.cncb.ac.cn/ncov/>).

Нуклеиновая кислота, вектор, клетка.

Изобретение также включает нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный антигенный белок по изобретению. Нуклеиновая кислота может быть изолированной (молекула нуклеиновой кислоты) или быть встроенной в другую нуклеиновую кислоту или вектор. Нуклеиновая кислота может быть использована для внедрения последовательности, кодирующей белок по изобретению, в клетку, ее клонирования, транскрипции в клетке, а также для экспрессии белка. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, предпочтительно ДНК.

Последовательность нуклеотидов нуклеиновой кислоты соответствует, с учетом генетического кода, последовательности белка по изобретению. Однако понятно, что в силу вырожденности генетического кода могут существовать множество вариантов последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тот же самый белок, и все они входят в объем изобретения. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гибридный белок по изобретению может быть оптимизирована для обеспечения стабильного и высокого уровня экспрессии известными специалистам методами.

Под молекулой нуклеиновой кислоты в настоящем изобретении также понимается гибридный ген, содержащий в функциональном сцеплении друг с другом по меньшей мере один промотор, который является функциональным в организме-хозяине, последовательность, кодирующую гибридный белок в соответствии с изобретением, и терминаторный элемент, который является функциональным в том же организме-хозяине. Различные элементы, которые могут содержать гибридный ген, представляют собой, во-первых, элементы, регулирующие транскрипцию, трансляцию и созревание белков, такие как промотор, последовательность, кодирующую сигнальный пептид или транзитный пептид, или терминаторный элемент, составляющий сигнал полиаденилирования, и, во-вторых, полинуклеотид, кодирующий белок. Выбор регуляторных элементов зависит от клетки-хозяина, в котором они должны функционировать, и специалисты в данной области техники способны без дополнительного экспериментирования выбрать необходимые регуляторные элементы (в частности, описанные в Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Промоторы, которые могут содержать гибридный ген в соответствии с изобретением, являются либо конститутивными, либо индуцибельными. Например, универсально эффективным промотором, используемым для экспрессии в клетках млекопитающих, является рСМV (промотор цитомегаловируса).

В соответствии с изобретением гибридный ген может также содержать другие регуляторные последовательности, которые локализованы между промотором и кодирующей последовательностью, такие как транскрипционные активаторы (энхансеры).

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота по изобретению включает старт-кодон и сайты рестрикции, подходящие для клонирования в выбранный вектор.

В еще одном воплощении изобретение относится к вектору, включающему вышеуказанную нуклеиновую кислоту, и который, таким образом, кодирует гибридный белок по изобретению. Назначение векторов известно специалистам в данной области и изобретение не ограничивается конкретным назна-

чением. Вектор может представлять собой вектор для клонирования, транскрипционный вектор и/или экспрессионный вектор. Предпочтительно вектор представляет собой экспрессионный вектор, т.е. содержит как минимум промотор помимо указанной нуклеиновой кислоты; соответственно вектор предназначен для экспрессии гибридного белка по изобретению. Вектор может представлять собой плазмиду, вирусный вектор (ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы и прочее), YAC (искусственную хромосому дрожжей), BAC (искусственную хромосому бактерий), HAC (искусственную хромосому человека), бактериофаги и другие типы векторов. Вектор может быть кольцевым или линейным, одноцепочечным или двуцепочечным. Предпочтительно, вектор представляет собой плазмиду. Примеры готовых для использования (например, база http://genome-www.stanford.edu/vectordb/vector_pages/plasmid_pages/Plasmid.html). Примеры плазмид, которые позволяют относительно легко вводить экспрессионные кассеты, хорошо известны в данной области техники и доступны коммерческим путем (WO1990002189, US 20140065699, US 2001/0016351).

Вектор может быть способен интегрироваться в геном клетки. Поскольку вектор представляет собой, по сути, нуклеиновую кислоту, включенную или не включенную в оболочку (как в вирусах), все аспекты, раскрытые выше в отношении нуклеиновой кислоты по изобретению, также относятся и к вектору, в частности что касается кодирующих и регуляторных элементов. Вектор может включать гены для маркеров трансформации, указывающие на трансформацию клетки-хозяина вектором, и они известны специалистам в данной области техники (см., например WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 и WO 97/04103).

Примеры векторов, на основе которых может быть получен вектор по изобретению, включают, без ограничения, pBR322, pET-24a(+), pUC19, pGEX-3X, AAV (аденоассоциированный вирус), бакуловирус и т.д. Множество векторов коммерчески доступны (см., например, <https://www.genscript.com/expression-vector-selection-guide.html>).

Клетка, которая также может называться клеткой-хозяином, включает раскрытый здесь вектор или нуклеиновую кислоту и способна, следовательно, нести генетическую информацию о гибридном белке по изобретению и экспрессировать его. Клетка может предназначаться как для производственных целей - для получения (продукции) белка по изобретению, так и для целей поддержания генетической информации в коллекции культур. Иными словами, назначение клетки не ограничено.

Таким образом, белок по изобретению может быть продуцирован в клетках, наработан в необходимых количествах и выделен из клеток и/или культуральной среды. Клетка не ограничена в отношении вида организма, из которого она получена, и может представлять собой прокариотическую и эукариотическую клетку, например дрожжи, такие как *S. cerevisiae*, бактерии, такие как *E. coli*, клетки насекомых, животные клетки, например клетки млекопитающего, в частности человека или хомяка (СНО). В некоторых воплощениях клетка пригодна для получения лизата для бесклеточного продуцирования белка по изобретению.

Применение белка.

Гибридный белок по изобретению является полезным мультиэпитопным антигеном, являющимся заменой SARS-CoV-2 в диагностических и исследовательских приложениях. Ценность белка состоит в присутствии специально подобранных эпитопов всех структурных белков SARS-CoV-2, которые доступны для узнавания соответствующими рецепторами, например антителами. При этом обеспечивается возможность, во-первых, не использовать сам вирус, что является преимуществом в связи с высокой контагиозностью вируса и риском для сотрудников лабораторий; во-вторых, не использовать набор антигенов, например отдельно белки N, S, M, E, что усложняло бы работу по их приготовлению, хранению, квантификации и т.п. Кроме того, белок является компактным по сравнению с полноразмерными белками, что упрощает его синтез и обращение с ним.

Одним из приложений гибридного белка по изобретению является возможность использования в тестах на оценку иммунитета к SARS-CoV-2.

В одном из воплощений гибридный белок применяют для оценки В-клеточного ответа.

При инфекции SARS-CoV-2 как правило спустя 2 суток начинают формироваться IgA, спустя 7 суток - IgM, на 10-14 сутки - IgG. Иногда антитела IgM и IgG появляются одновременно, что является одной из особенностей SARS-CoV-2. Наличие или отсутствие соответствующих антител, вкпе с наличием вируса или его антигенных фрагментов, имеет диагностическое значение для установления фазы инфекционного процесса:

- 1) острая фаза, серонегативный период ("период окна"): присутствует вирусный агент (РНК, антиген), отсутствуют антитела;
- 2) острая фаза, начинает развиваться иммунный ответ: в дополнение к вирусному агенту появляются IgA и, возможно, IgM;
- 3) острая фаза и выраженный иммунный ответ: появляются также и IgG;
- 4) поздняя стадия, начало выздоровления: вирусный агент исчезает, IgA, IgM и IgG присутствуют;
- 5) период выздоровления или полное выздоровление: IgA, IgM исчезают, IgG присутствуют.

Вместе с тем, описаны случаи сохранения IgA в крови переболевших пациентов.

Выявление иммуноглобулинов классов A, M, G (IgA, IgM и IgG) к SARS-CoV-2, а также выявление

антигенов SARS-CoV-2 входит в рекомендации по этиологической диагностике согласно Временным клиническим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19) Министерства здравоохранения РФ (версия 15,22.02.2022).

Целесообразно вначале провести отдельные тесты на IgM и IgG, а затем выявлять одновременно IgA, IgM и IgG.

Гибридный белок по изобретению может быть использован в качестве антигена в тестах на определение вышеуказанных антител. В иммунологических тестах антитела связываются со специфическими антигенами, и связывание можно непосредственно наблюдать с помощью соответствующих меток, присоединяемых, в зависимости от дизайна теста, к антителам против иммуноглобулина или к антигену. В зависимости от дизайна теста может производиться иммобилизация антитела или антигена на пластиковых титрационных микропланшетах, предметных стеклах (слайдах, чипах), фильтровальной бумаге (стрипы, полоски) или любом пригодном для таких целей материале.

В одном варианте твердофазных иммуноанализов антиген иммобилизуют на твердой фазе, обычно в лунках пластиковых планшетов для микротитрования, на стеклянных слайдах или бумажных полосках. Образец пациента (сыворотка крови или иной подходящий образец) инкубируют с антигеном, а связанное антитело после промывки визуализируют с помощью меченых антител против иммуноглобулина, также называемых "конъюгат". Если используемая метка представляет собой фермент, тест называется иммуноферментным анализом (ИФА, ELISA), и связанное антитело визуализируют с помощью ферментозависимой цветной реакции. Если используется флуоресцентная метка, метод называется иммунофлуоресцентным тестом (МФА). Наиболее часто используемыми ферментными метками являются пероксидаза хрена (HRP) и щелочная фосфатаза (AP). Если HRP-конъюгат связан с комплексами антитело-антиген, бесцветный хромоген (например, ортофенилдиамин, OPD) становится желтым, а интенсивность окраски пропорциональна количеству связанного конъюгата и количеству специфических антител в образце; в отсутствие специфических антител цветная реакция не возникает. Альтернативой OPD является ТМВ.

Используя конъюгаты анти-IgG или анти-IgM, можно отдельно определить подклассы иммуноглобулинов, что позволяет добиться вышеуказанного отдельного определения этих антител.

Белок по изобретению пригоден для использования в любых иммунологических тестах, в которых обычно применяются синтетические или природные антигены, и не требует какой-либо специальной адаптации методик проведения таких тестов. Особенности проведения ИФА и подобных анализов хорошо известны специалистам в данной области (Slagle, K.M., & Ghosn, S.J. (1996). *Immunoassays: Tools for Sensitive, Specific, and Accurate Test Results*. *Labmedicine*, 27, 177-183; ОФС.1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа).

В связи с необходимостью оперативно диагностировать население особую ценность приобретают экспресс системы для диагностики SARS-CoV-2, основанные на иммунохроматографических методах. В них используют пригодный для хроматографии материал, например полоску из фильтровальной бумаги, на которую предварительно нанесены конъюгат антигена SARS-CoV-2 (например с частицами коллоидного золота). Образец - цельную кровь, сыворотку или плазму - наносят в определенное место на полоске, из которого образец под действием капиллярных сил проходит через область с антигеном, который связывает антитела к SARS-CoV-2, если они присутствуют в образце, далее образец проходит через нитроцеллюлозную мембрану, на которой расположены вторичные антитела, связывающие соответствующие изотипы антител, и контрольные антитела. В пределах около 10 мин визуально определяют наличие окрашивания в соответствующих областях полоски и делают заключение о наличии соответствующих антител и, следовательно, о перенесенной инфекции. Методы изготовления иммунохроматографических тестов хорошо известны специалистам в данной области (Wen, Tian & Huang, Chao & Shi, Feng-Juan & Zeng, Xiao-Yan & Lu, Tian & jiao, Yongjun. (2020). *Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus*. *The Analyst*. 145).

В другом воплощении гибридный белок применяют для оценки Т-клеточного ответа.

Известно, что Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 может сохраняться в течение около 10 месяцев у переболевших COVID-19 пациентов (Jung, J.H., Rha, M.S., Sa, M. et al. *SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells*. *Nat Commun* 12, 4043 (2021)). Известны случаи перенесения инфекционного процесса без развития симптомов и без образования соответствующих антител, что говорит о том, что Т-клеточный ответ может бороться с инфекцией без вовлечения В-клеточного ответа. Анализ, направленный на оценку Т-клеточного ответа у субъекта, следовательно, может быть крайне полезен для эпидемиологических исследований и для уточнения иммунного статуса субъекта.

Оценить Т-клеточный иммунитет можно, например, методом ELISpot или его аналогом FluoroSpot. Принцип данных методов сводится к детекции секретируемых Т-лимфоцитами цитокинов антителами, специфическими к этим цитокинам. Если Т-лимфоциты ранее уже имели контакт с антигеном, например если субъект уже был инфицирован вирусом, то при обработке антигеном они активируются и начинают вырабатывать гамма-интерферон (IFN γ). По окончании процесса проводится визуализация и подсчет клеток, которые уже встретились с вирусом (выглядят как точки на мембране). Подсчет точек может

осуществляться автоматически. Помимо IFN γ , анализом могут быть иные цитокины, например IL-2, TNF-alpha, IL-4, IL-5, IL-13, или иммуноглобулины, хемокины, аполипопротеины и т.п.

Гибридный белок по изобретению пригоден для использования в ELISpot или FluoroSpot, а равно как и в любых других методах для оценки Т-клеточного ответа, и не требует какой-либо специальной адаптации таких методов. Особенности ELISpot и FluoroSpot известны специалистам (Janetzki S. Immune monitoring technology primer: the enzyme-linked immunospot (Elispot) and Fluorospot assay. J Immunother Cancer. 2015 Jul 21;3:30).

Дополнительные сведения об особенностях диагностических тестов, связанных с COVID-19 и SARS-CoV-2, известны специалистам из уровня техники (см., например, Kilic T, Weissleder R, Lee H. Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19: Current Status and Challenges. iScience. 2020 Aug 21;23(8):101406).

Гибридный белок по изобретению также может быть использован в проточной цитометрии (в частности, в проточной цитофлуорометрии (FACS), см. Пример 3) или в иммуномагнитном разделении клеток.

В целом, область применений гибридного белка по изобретению не ограничивается вышеуказанными подходами и методами. Так, например, он может использоваться без ограничения в исследованиях, в частности для определения связывающей способности различных конструкций, например TCR (Т-клеточный рецептор), CAR (химерный рецептор антигена) и т.п. Белок также может использоваться, например, в качестве стандартного реагента, в частности в качестве положительного контроля в тестах на присутствие антигена или для построения калибровочной кривой; или иным образом, как известно специалистам в данной области.

Набор по изобретению может представлять собой любой набор для проведения иммунологического анализа, относящегося к диагностике иммунного статуса по отношению к SARS-CoV-2, например ИФА-набор, МФА-набор, иммунохроматографический (экспресс-тест) набор. Как правило, такие наборы предназначены для определения присутствия и, возможно, уровня антител к SARS-CoV-2. Набор может включать одну или несколько пробирок или планшет, необязательно с предварительно иммобилизованным в них антигеном (включающим белок по изобретению) или антителом, совокупность реагентов и приспособлений для осуществления нанесения образца, связывания анализа, промывки, визуализации, инструкции по проведению анализа. Набор для экспресс-теста включает полоску (стрип) с предварительно нанесенными на нее антигеном (включающим белок по изобретению), вторичными антителами, контрольными реагентами, а также необязательно приспособления для нанесения и, возможно, взятия образца у субъекта.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Пример. 1. Получение белка.

В качестве продуцентов гибридного белка по изобретению использовали E.coli (штаммы Rosetta и BL21(DE3)). Использование этих организмов не является обязательным, и можно использовать любые другие, например дрожжевые и эукариотические продуценты.

Последовательность гена была синтезирована в сторонней организации. Встраивание в вектор pET24a(+) проводилось по сайтам рестрикции XhoI и NdeI. Последовательность вставки и полная последовательность вектора представлены в SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно. Карта вектора со вставкой представлена на фиг. 2. Трансформацию штамма-реципиента проводили методом электропорации. Биомассу нарабатывали в биореакторе в рекомендуемых для указанных штаммов условиях с последующей индукцией лактозного оперона изопропил- β -D-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ, IPTG) в течение 3 ч. После этого биомассу лизировали с последующей сепарацией телец включения, содержащих целевой белок, который переводили в раствор через солюбилизацию и рефолдинг. Окончательную очистку белка проводили с помощью жидкостной хроматографии с использованием анионообменных и гидрофобных сорбентов.

Пример 2. Оценка В-клеточного иммунного ответа.

Для оценки В-клеточного ответа с помощью метода Вестерн-блоттинга (WB) проводили сравнение связывания коммерческого нативного N белка (Byorbyt, Великобритания, далее - сравнительный белок) и белка, полученного в Примере 1, с антителами к структурным белкам M, S, N, E SARS-CoV-2:

SARS-CoV-2 Envelope Antibody (Моноклональное мышинное IgG2B, Клон # 1044526, Bio-Techne, США, кат. номер: MAB10894);

Anti-SARS-CoV/SARS-CoV-2 Nucleocapsid Monoclonal Antibody (Solarbio, Китай, кат. номер: K200094M);

2019-nCoV S antibody (Byorbyt, Великобритания, кат. номер: orb669713);

SARS-CoV-2 Membrane Antibody (Моноклональное мышинное IgG2B Клон # 1041508, Bio-Techne, США, кат. номер: MAB10690).

Для детекции указанных антител использовали конъюгат вторичных антител с пероксидазой хрена. Goat Anti-Rabbit IgG conjugate (HRP) (EMD Millipore Corp, США, кат. номер: 12-348).

Белок согласно Примеру 1 и сравнительный белок наносили по 0,5 мкг в лунки полиакриламидного

геля (ПААГ). После проведения электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (додецилсульфата натрия) осуществляли перенос белков на PVDF мембрану (поливинилидендифторид) для формирования иммобилизованного на мембране комплекса: анализируемый белок - специфичное антитело - вторичное антитело - пероксидаза хрена. Во всех экспериментах использовали отрицательный контроль - проверка неспецифического связывания конъюгата с исследуемыми белками.

Протокол проведения WB был следующим: после переноса исследуемых белков на PVDF мембрану при 350 мА в течение 1-2 ч, мембрану инкубировали в забивочном буфере (3% казеинат натрия) 30 мин при перемешивании, затем добавляли первичные антитела в разведении 1:400 и инкубировали мембрану 3 ч. Затем мембрану инкубировали в отмывочном буфере (раствор PBS (фосфатно-солевой буфер)) 3 раза по 5 мин, смывая первичные антитела. Далее добавляли растворенные в блокирующем буфере вторичные антитела в разведении 1:10000, специфичные к Fc-фрагментам первичных антител, конъюгированные с ферментной меткой - пероксидазой хрена. Образовавшиеся в месте локализации исследуемого белка иммунные комплексы проявлялись с помощью хромогенного субстрата ТМВ (тетраметилбензидин), продукт реакции которого с пероксидазой хрена имеет интенсивную окраску и выпадает на мембране в виде нерастворимого осадка.

В результате наблюдали специфическое связывание белка согласно Примеру 1 с каждым из антител к структурным белкам М, S, N, E SARS-CoV-2. Белок сравнения - коммерчески доступный нативный N белок - связывался специфически с антителами к N белку и не связывался с антителами к белкам М, S, E. Полученные результаты свидетельствуют, что эпитопы в белке по изобретению подобраны правильно, все эпитопы узнаются соответствующими специфическими антителами. Иными словами, белок по изобретению подходит для исследования оценки В-клеточного ответа в отношении всех структурных белков SARS-CoV-2.

Пример 3. Т-клеточный иммунный ответ.

Вирусы и культуры клеток.

В исследовании способности белка согласно Примеру 1 вызывать Т-клеточный ответ использовали лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2, выделенный на на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19 из РФ, - "Дубровка" (GenBank: MW161041.1). Культивирование вируса проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И. И. Мечникова (далее - культура клеток Vero). Клетки культивировали при 37°C в питательной среде DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) с L-глутамином (300 мкг/мл) и глюкозой 4,5 г/л, 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂. Штамм прошел 20 последовательных пассажей и вызывал выраженное ЦПД (цитопатическое действие). Образцы вирусного материала для проведения работы хранили при температуре -80°C в виде аликвот. Для титрования вирусов для заражения животных, вирусного материала из легких животных и характеристики вирусов также использовали перевиваемую культуру клеток эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81. Определение инфекционного титра использованного пула вируса показало, что титр составлял 10^{7,5} ТЦИД₅₀ в 0,1 мл.

Экспериментальные животные.

Для изучения иммуногенности белка согласно Примеру 1 использовали 50 самцов и самок трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США). Поставка животных осуществлялась из ФИБХ РАН Питомник "Пушино" (Столбовая, Московская обл., РФ), в котором до дня поставки их содержали на карантине. Поставщик имел ветеринарное свидетельство о соответствии деятельности подконтрольного Госветнадзору объекта ветеринарным требованиям, правилам и нормам. Всех животных перед началом испытаний осматривали, из опыта исключали животных с внешними признаками недомогания (нарушения в движении, закрыты глаза и т.п.). Ежедневно в течение всего опыта проводили наблюдение за животными, отмечая их состояние, отношение к воде и пище (осмотр визуальный). Рандомизацию животных проводили по массе. Маркировку животных проводили при помощи окраски фукорцином. На карточке клетки, в которой содержались животные, указывали название исследования и номер группы. Эксперименты проводили в осенне-летнее время (сентябрь-октябрь 2021 г.).

Содержание животных.

Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. Мышей, самки отдельно от самцов, размещали по 12-14 особей в пластиковых клетках (размер Д×Ш×В 35×20×15 см) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила в соответствии с нормами размещения. В комнате содержания животных поддерживали следующие условия: температура окружающего воздуха 18-26°C; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (08:00-20:00 - день, 20:00-08:00 - ночь); относительная влажность 30-70%; вентиляция без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час. Кормили животных брикети-

рованными кормами в соответствии с утвержденными нормами. Поение животных осуществлялась дистиллированной водой. Доступ животных к воде и пище был неограничен.

Карантин животных.

Мыши адаптировались в виварии в отдельной комнате в течение 3 дней до начала введения анализируемых образцов. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр внешнего состояния животных и клинический осмотр до рандомизации. Животных с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями не выявлено.

Эвтаназия.

Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) производилась ответственным лицом в соответствии с принятыми требованиями путем дислокации шейных позвонков с предварительным наркозом эфиром. Эвтаназия осуществлялась своевременно по окончании экспериментов, без причинения страданий.

Заражение животных.

Проведение заражения животных осуществляли вирусом SARS-CoV-2 "Дубровка" ($10^{3,75}$ TCID₅₀ (доза заражения 50% культуры ткани). Всех мышей заражали интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 30 мкл в обе ноздри. За животными вели ежедневное наблюдение в течение последующих 16 дней, мышей ежедневно взвешивали. Животных, потерявших 25% своей первоначальной массы, гуманно умерщвляли и в дальнейшем рассматривали как умерших от инфекции.

Отбор селезенки.

Отбор селезенки для получения фракции Т-лимфоцитов осуществляли на 16 день после заражения у выживших мышей экспериментальной и контрольной групп.

Т-клеточный иммунный ответ.

Мышей выводили из опыта через 4 недели после последней иммунизации путем декапитации в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР (1985). В день окончания опыта отбирали селезенки в асептических условиях. Материал каждой группы объединяли - селезенки мышей одной группы помещали в питательную среду IMDM (среда Дульбекко в модификации Искова; Gibco) и гомогенизировали. Затем выщеляли Т-лимфоциты.

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

Далее проводили стимуляцию полученных лимфоцитов белком согласно Примеру 1 в концентрации 40 мкг/мкл, стафилококковым энтеротоксином В (SEB) в качестве положительного контроля и средой RPMI в качестве отрицательного контроля.

Полученные лимфоциты окрашивали для идентификации. Содержимое каждой лунки планшета переносили в 5 мл пробирку (Beckman Coulter, США), фосфатным буфером (pH = 7,4) доводили до объема 4 мл, клетки осаждали центрифугированием при $400 \times g$ в течение 5 мин, супернатант удаляли, и добавляли в пробирку 2,5 мкл антител, меченных флуоресцентным красителем, с последующей двукратной отмывкой холодным PBS буфером. Использовали моноклональные антитела (Caltag Laboratories, США), конъюгированные с красителями против клеточных антигенов: APC (аллофикоцианин; Molecular Probes, США) для индикации живых клеток, Alexa Fluor 700 (Molecular Probes, США) для индикации лимфоцитов, FITC (5/6-флуоресцеина изотиоцианат; ThermoFisher Scientific, США) для индикации CD4+ Т-лимфоцитов, PE-PC5.5 (Abeam, США) для индикации CD8+ Т-лимфоцитов, PE (Abcam, США) для индикации Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон-гамма (IFN γ). Полученные лимфоциты анализировали на проточном цитометре Gallios Navios (Beckman Coulter, США).

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

Анализировали уровни экспрессии молекул субпопуляции Т-клеток: CD4, CD8, а также IFN γ . Гейт (окно) популяции устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. Сбор данных производили с использованием программы System II Software (Beckman Coulter, США). В каждом эксперименте проводился анализ не менее 50 тысяч клеток. Результаты представлены на фиг. 1.

В отсутствие стимуляции и при стимуляции гибридным белком по изобретению в обеих группах количество CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было больше, чем CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ .

В отсутствии стимуляции и при стимуляции гибридным белком по изобретению количество Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , было меньше у интактных животных, чем в группе животных, иммунизированных плазмидной ДНК в/м. При стимуляции SEB наблюдали обратную ситуацию.

В группе интактных животных при стимуляции гибридным белком по изобретению количество Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , уменьшалось, а в группе зараженных животных - увеличивалось.

Самое малое количество как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдалось в группе интактных животных, после стимуляции гибридным белком по изобретению. Самое большое количество как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , наблюдали в группе зараженных животных после стимуляции гибридным белком по изобретению.

Преваляирование CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ , над Т-хелперами, синтезирующими IFN γ , при стимуляции гибридным белком по изобретению увеличивалось в группе зараженных животных в сравнении с состоянием без стимуляции.

Полученные результаты показывают, что гибридный белок по изобретению подходит для оценки формирования Т-клеточного иммунного ответа вследствие перенесенной коронавирусной инфекции.

Представленные выше примеры предназначены лишь для иллюстрации изобретения, но не должны толковаться как ограничение объема прав патентообладателя, который определяется исключительно формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный антигенный белок, содержащий каждую из аминокислотных последовательностей следующих фрагментов структурных белков штамма SARS-CoV-2 дикого типа:

- a) полная последовательность N белка, представляющая собой SEQ ID NO: 2,
- b) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 6-20 E белка, представляющая собой SEQ ID NO: 5,
- c) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 129-143 M белка, представляющая собой SEQ ID NO: 7,
- e) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 345-360 S белка, представляющая собой SEQ ID NO: 9,
- f) последовательность, соответствующая аминокислотным остаткам 500-520 S белка, представляющая собой SEQ ID NO: 10,

или последовательностей гомологичных фрагментов из штамма SARS-CoV-2, отличающегося от дикого типа, при этом гомологичные фрагменты устанавливают относительно аминокислотных остатков фрагментов a, b, c, e, f путем выравнивания аминокислотной последовательности соответствующего белка указанного иного штамма относительно аминокислотной последовательности этого же белка в штамме дикого типа; при этом белок характеризуется порядком b-c в направлении от N- к С-концу.

2. Белок по п. 1, дополнительно содержащий:

- d) последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 36-50 E белка штамма SARS-CoV-2 дикого типа, представляющая собой SEQ ID NO: 8, или последовательность гомологичного фрагмента из штамма SARS-CoV-2, отличающегося от дикого типа, при этом гомологичный фрагмент устанавливают относительно аминокислотного остатка фрагмента d путем выравнивания аминокислотной последовательности соответствующего белка указанного иного штамма относительно аминокислотной последовательности этого же белка в штамме дикого типа;

причем белок характеризуется порядком b-c-d в направлении от N- к С-концу.

3. Белок по п.1 или п.2, где штамм SARS-CoV-2, отличающийся от дикого типа, выбран из следующих: альфа, бета, гамма, дельта, омикрон, дубровка.

4. Белок по любому из пп.1-3, содержащий одну или несколько из следующих последовательностей:

- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3 или 4;
- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 или 6;
- последовательность SEQ ID NO: 7;
- последовательность SEQ ID NO: 8;
- последовательность SEQ ID NO: 9;
- последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 10 или 11.

5. Белок по п.1, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, 14, 15, 16, 17 или 18.

6. Белок по любому из пп.1-5, характеризующийся тем, что мечен детектируемой меткой.

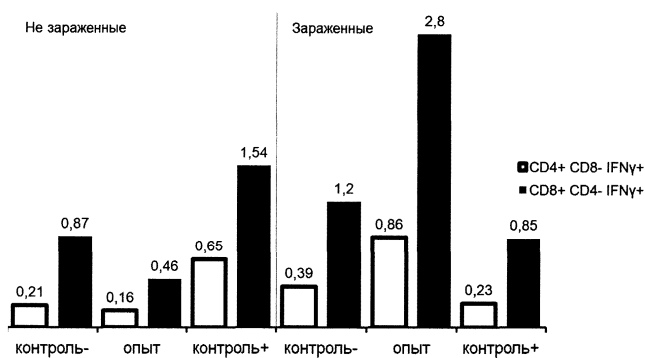
7. Белок по любому из пп.1-6, характеризующийся тем, что является иммобилизованным на субстрате.

8. Белок по любому из пп.1-6, характеризующийся тем, что содержит последовательность, выбранную из His-tag, сайта распознавания протеазы, последовательности, усиливающей иммунный ответ, или комбинации указанного.

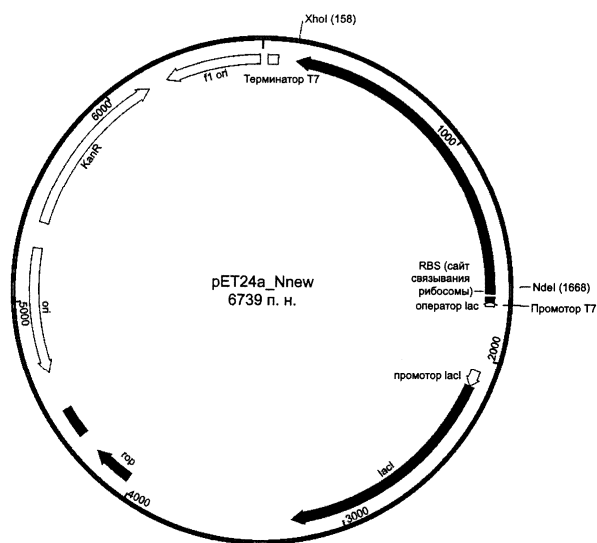
9. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок по любому из пп.1-5.

10. Вектор для экспрессии белка по любому из пп.1-5, содержащий нуклеиновую кислоту по п.9.

11. Клетка-хозяин для продукции белка по любому из пп.1-5, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9 или вектор по п.10.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2