

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390629 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.24

(22) Дата подачи заявки
2021.08.05

(51) Int. Cl. A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИН ПРОТИВ SARS-CoV-2 НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО В ВИДЕ ДИМЕРА, И ВЕЗИКУЛЫ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МЕНИНГОКОККОВЫХ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ В

(31) 2020-0057

(32) 2020.08.20

(33) CU

(86) PCT/CU2021/050007

(87) WO 2022/037727 2022.02.24

(71) Заявитель:

ИНСТИТУТО ФИНЛИ ДЕ
ВАКУНАС; СЕНТРО ДЕ
ИНМУНОЛОГИА МОЛЕКУЛАР (CU)

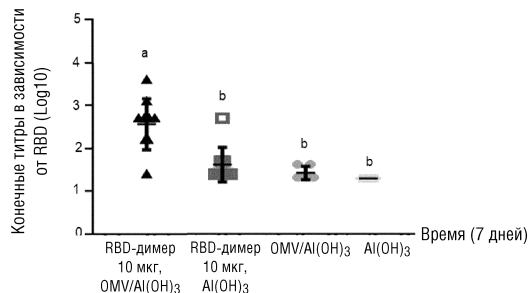
(72) Изобретатель:

Вальдес Балбин Юрий, Верес
Бенкомо Висенте Гилльермо, Гарсия
Ривера Дагмар, Климент Руис Янет,
Фернандес Кастильо Сонсире,
Родригес Нода Лаура Марта, Гонсалес
Родригес Умберто, Рамирес Гонсалес
Убел Хесус, Човел Куэрво Марио
Ландис, Перес Никадо Рокмира,
Санчес Рамирес Белинда, Охито
Магас Эдуардо, Боджано Аё Тамми,
Олива Эрнандес Рейналдо (CU), Чэнь
Гуан У (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к биотехнологии; в частности, к области здоровья человека. Описанные вакцинные композиции индуцируют нейтрализующий иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2. Эти композиции включают часть рецептор-связывающего белка вируса SARS-Cov-2 в качестве антигена, везикулы наружной мембраны бактерий *Neisseria meningitidis* группы В в качестве иммуностимулирующего компонента и адъювант. Вакцинные композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2.



A1

202390629

202390629

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577328EA/032

КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИН ПРОТИВ SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО В ВИДЕ ДИМЕРА, И ВЕЗИКУЛЫ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МЕНИНГОКОККОВЫХ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ В

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Это изобретение относится к области биотехнологии; в частности, к вакцинам для профилактики COVID-19. Более конкретно, изобретение относится к новым вакцинным композициям, разработанным для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2. Эти композиции содержат рецептор-связывающий домен («RBD») вируса SARS-CoV-2 в качестве релевантного антигена, который экспрессируется в виде стабильного димера, а также везикулы наружной мембраны («OMV») бактерий *Neisseria meningitidis* группы В и адьювант. Такая комбинация может индуцировать высокие титры антител и клеточный ответ против вируса SARS-CoV-2.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Недавно произошла вспышка COVID-19: впервые она была идентифицирована в Ухане, Китай, в декабре 2019 года, где были зарегистрированы первые серьезные случаи пневмонии неизвестной этиологии. Вызываемое вирусом SARS-CoV-2, заболевание характеризуется быстрым распространением от человека к человеку, а также такими проявлениями, такими как лихорадка, ринорея, боль в горле и затрудненное дыхание, наблюдаемые у симптоматичных пациентов, на долю которых приходится менее 50% от общего числа случаев COVID-19, в то время как у большинства пациентов это заболевание протекает бессимптомно, что является ключевым фактором распространения вируса и представляет собой эпидемиологическую проблему с точки зрения его контроля (отчеты ВОЗ по коронавирусной болезни (COVID-2019) представлены на сайте www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports (по состоянию на 13 августа 2020 г.)).

Другие коронавирусы, подобные SARS-CoV-2, известные как MERS и SARS, уже вызывали эпидемии в предыдущие десятилетия. SARS имеет высокую гомологию с SARS-CoV-2. Одним из основных сходств является то, что в качестве рецептора для проникновения в клетки человека оба вируса используют белок ACE2. Следовательно, как в случае SARS, так и в случае SARS-CoV-2 взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) вирусного белка S1 с белком ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) является решающим фактором заражения вирусом. (Walls A et al. (2020) Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>). RBD белка S SARS-CoV-2 представляет собой фрагмент, состоящий приблизительно из 195 аминокислот (последовательность 333-527), который содержит рецептор-связывающий мотив (RBM) и является областью, ответственной за взаимодействие вируса с рецептором ACE2. Присутствие анти-RBD антител коррелирует с нейтрализующей активностью, обнаруженной в сыворотке

реконвалесцентов COVID-19 (Dai L. et al.; 2020, Cell <https://doi.org/10.1016/i.cell.2020.06.035>; Quinlan B.D. et al., 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036418>, Zang J. et al., 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.107565>) и <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT0RR66085&draw=2&rank=1>, по состоянию на 17 августа 2020 г.). Следовательно, вакцины, индуцирующие анти-RBD антитела, вероятно, стимулируют образование антител, нейтрализующих вирус.

RBD использовали в качестве специфического антигена в вакцинах против SARS в комбинации с алюминием и другими известными адъювантами. В настоящее время эта стратегия применяется для приготовления вакцин против SARS-CoV-2, которые индуцируют высокоспецифичный ответ в виде анти-RBD антител, способный защитить от проникновения вируса в клетку.

На сегодняшний день (10 августа 2020 г.) на стадии доклинических испытаний находятся 139 вакцин-кандидатов против SARS-CoV-2, и 28 вакцин-кандидатов проходят клинические испытания; по меньшей мере восемь из этих кандидатов (в том числе два на стадии клинических испытаний) содержат RBD в качестве специфического антигена. Кроме того, три вакцины-кандидата в доклинических испытаниях включали некоторые OMV в качестве вакцинной платформы (Проект общей картины и отслеживания вакцин-кандидатов против COVID-19 [DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines] - 10 августа 2020 г., <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, по состоянию на 10 августа 2020 г.).

RBD в своей мономерной форме, абсорбированный на оксиде алюминия, также использовали в экспериментах на животных, где он продемонстрировал способность индуцировать нейтрализующие антитела без антителозависимого усиления (Quinlan B.D. et al., 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036418>; Zang J. et al., (2020) <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.107565>). RBD также продуцировали в разных хозяевах; при этом характер гликозилирования аспарагина 331 и 343 зависел от хозяина экспрессии (Chen W.H. et al., 2017 *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106: 1961-1970). RBD-мономер, абсорбированный на $Al(OH)_3$ в концентрациях до 50 мкг, рекомендован в качестве вакцины против SARS-CoV у людей (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04466085?term=NCT04466085&draw=2&rank=1>, по состоянию на 17 августа 2020 г.). Другие составы включали белок RBD, включающий аминокислотные остатки с 319 по 545, экспрессированные в клетках насекомых и *Vaculoviridae*, однако сведения о получении димера отсутствуют (Yang J. et al., 2020: *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>).

Техническим решением, наиболее близким к настоящему изобретению, является состав вакцины против COVID-19, который представляет собой комбинацию RBD-димера, экспрессируемого в клетках CHO в виде тандема, и адъюванта. Эта вакцина была разработана Институтом микробиологии Китайской академии наук в сотрудничестве с Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutics. Состав этой вакцины вызывал сильный иммунный

ответ с титрами специфических антител, достигающими 10^5 (Dai L. et al., 2020; Cell <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>). Эта вакцина-кандидат находится на стадии клинических испытаний. В указанном изобретении димер получали путем клонирования кодирующей последовательности димера; т.е., в отличие от изобретения, обсуждаемого ниже, оно основано на клонировании аминокислотной последовательности мономера, которая обеспечивает димеризацию RBD-мономера.

Другие вакцины-кандидаты, находящиеся в настоящее время на стадии доклинических испытаний, основаны на очищенных, генетически модифицированных везикулах, несущих вирусные фрагменты, разработанные институтом Quadram и BiOMViSSrl (по адресу <https://quadram.ac.uk/quadram-researchers-working-on-covid-19-vaccine-join-who-expert-groups>, по состоянию на 17 августа 2020 г.). Другие компании, такие как Intravacc, объединяли иммуногенные свойства OMV с белком S SARS-CoV-2 (<https://www.hospimedica.com/epivax-and-intravacc-to-jointly-develop-covid-19-vaccine-based-on-novel-click-on-omv-technology/articles/294782783/epivax-and-intravacc-to-jointly-develop-covid-19-vaccine-based-on-novel-click-on-omv-technology.html>, по состоянию на 17 августа 2020 г.).

Вакцина-кандидат, полученная авторами настоящего изобретения путем объединения OMV менингококковых бактерий группы В с RBD в форме стабильного димера, неожиданно превосходила известные вакцинные композиции на основе RBD по кинетике продуцирования антител и интенсивности иммунологического ответа, аффинности продуцируемых антител и их нейтрализующей способности, и ответу клеток Т-хелперов 1 («Th-1»), которые являются важнейшими характеристиками в условиях пандемии SARS-CoV-2. Вакцинные композиции, описанные в настоящем изобретении, вызывают гуморальный ответ в виде IgG-антител к RBD на 7-ой день после иммунизации с поляризацией клеточного ответа по типу Th1, характеризующемуся индукцией IFN γ и изотипом IgG2a; по этой причине в этом случае отсутствуют иммунопатологические эффекты, которые наблюдались для вакцин против коронавируса, индуцирующих ответ по типу Th2.

Ни в одном из технических решений и/или научных публикаций, предшествовавших этому изобретению, не описывалась какая-либо вакцина, основанная на комбинации димеризованных RBD и OMV менингококковых бактерий группы В. Замечательным свойством этой комбинации является то, что индуцированный иммунный ответ на RBD сильнее, чем ответ, индуцированный вакцинами, не содержащими этих везикул. Таким образом, новизна этого изобретения касается новых вакцинных композиций против COVID-19, которые индуцируют сильный иммунный ответ против вируса.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, индуцирующим защитный иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2, которые содержат димер рецептор-связывающего домена («RBD») белка S вируса SARS-Cov-2 в качестве антигена,

а также везикулы наружной мембраны («OMV») бактерий *Neisseria meningitidis* группы В в качестве иммуностимулирующего средства. В частности, антиген RBD содержит остатки 319-541, показанные в SEQ ID NO. 1. В положении 538 находится свободный цистеин, что позволяет RBD формировать димерную структуру. Эти вакцинные композиции также могут включать адъювант, выбранный из группы, включающей любую минеральную соль, такую как, без ограничения, гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения OMV, состоящему из следующих стадий: i) OMV солибилизируют путем встряхивания в воде фармацевтической чистоты; и ii) затем OMV обрабатывают ультразвуком при температуре ниже 10°C.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению вышеуказанных вакцинных композиций для предотвращения заражения вирусом SARS-CoV-2; в частности, применению указанных вакцинных композиций для индукции раннего гуморального ответа в виде IgG-антител к вирусу SARS-CoV-2. Вакцинная композиция содержит RBD в диапазоне концентраций от 5 до 50 мкг на дозу, OMV в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг и адъювант в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,0 мг/мл, которую применяют в виде 1-3 внутримышечных инъекций, предпочтительно 2 инъекций.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению представленных в настоящем описании вакцинных композиций для индукции клеточного ответа против вируса SARS-CoV-2, смещенного в сторону Th-1 типа, в схеме внутримышечной иммунизации предпочтительно двумя дозами, содержащими 5-50 мкг RBD и 10-100 мкг OMV, а также 0,5-2,0 мг/мл гидроксида алюминия, где применение включает 1-3 инъекции или, предпочтительно, 2 инъекции.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения антигена RBD

Последовательность, кодирующую белок RBD, синтезируют и субклонировать в вектор экспрессии pcDNA-3.1. Аминокислотная последовательность RBD представляет собой область 319-541. Конструкцию, содержащую целевой белок, трансфицируют в клетки CHO.

Целевой белок собирают центрифугированием и фильтрованием. Затем собранный материал загружают на аффинную колонку Ni-Sepharose с последующей очисткой на колонке Superdex 200. Используя соответствующие методы, очищенный белок анализируют (размер молекулы, чистоту, идентичность и аминокислотную последовательность с помощью таких методов, как SDS-PAGE, SEC-HPLC и/или MS).

В ходе очистки RBD в присутствии воздуха (т.е. в мягких окислительных условиях) RBD димеризуется путем образования дисульфидного мостика, связывающего два свободных цистеина в положении 538 в обоих мономерах. Этот межмолекулярный дисульфидный мостик является стабильным и может быть разрушен только в

восстановительных условиях.

OMV экстрагируют из *Neisseria meningitidis* и очищают в соответствии с CU 21888A1.

Вакцинные композиции

Этот состав представляет собой суспензию для инъекций, содержащую RBD-димер, везикулы наружной мембраны (OMV) бактерий *Neisseria meningitidis* группы B и гидроксид алюминия в качестве адьюванта.

Недавно разработанные вакцины, представленные в настоящем описании, содержат RBD белка S вируса SARS-CoV-2 в качестве соответствующего антигена, который экспрессируется в виде стабильного димера. Аминокислотная последовательность RBD представляет собой область 319-541; эта область содержит девять остатков цистеина, восемь из которых образуют четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика, обеспечивая стабильную доменную структуру. В нативном белке цистеин 538 («C538») образует внутримолекулярный дисульфидный мостик. В этой конструкции, поскольку последовательность является укороченной до остатка 541, C538 является свободным. Как следствие, между двумя свободными C538 может образоваться межмолекулярный дисульфидный мостик, приводя к образованию стабильного димера, который является более иммуногенным, чем соответствующий мономер.

Везикула наружной мембраны (OMV) менингококковой бактерии группы B (150-300 нм) является ключевым компонентом ожидаемых эффектов настоящего изобретения. В растворе OMV обычно образуют кластеры с широким диапазоном размеров частиц. Получение OMV является важным процессом, обеспечивающим воспроизводимые иммуногенные кластеры с указанным диапазоном размеров (WO 2006/008504 A1). Настоящее изобретение предлагает препараты OMV, которые остаются стабильными в течение по меньшей мере десяти дней при температуре до 10°C, предпочтительно 2-8°C, с размером частиц до 500 нм, предпочтительно 100-300 нм или 150-300 нм, и изобретение предлагает способ получения OMV. В настоящем изобретении для стабилизации OMV осажденные в 70% этаноле OMV солюбилизируют в воде фармацевтической чистоты путем встряхивания при 500 об/мин или, предпочтительно, при 100-300 об/мин в течение по меньшей мере трех часов, или предпочтительно в течение одного-двух часов при 10-25°C. За этим процессом следует этап декластеризации в ультразвуковой ванне в диапазоне частот от 20 до 40 кГц и температуре ниже 10°C, или предпочтительно 2-8°C, в течение от 30 минут до 4 часов или предпочтительно в течение 1-3 часов. Скорость декластеризации OMV измеряют методом динамического рассеяния света (DLS), который позволяет определять средний размер частиц в препарате и их распределение по размерам.

Два компонента, RBD белка S вируса SARS-CoV-2, который экспрессируется в виде стабильного димера, и OMV, смешивают вместе путем встряхивания в течение 30 минут или предпочтительно 10-30 минут при температуре окружающей среды от 18°C до 25°C. Эту смесь RBD-OMV адсорбируют в геле гидроксида алюминия при 70-100% путем встряхивания при менее 500 об/мин, предпочтительно 100-300 об/мин, в течение от

тридцати минут до одного часа. Вакцины содержат фармацевтические рН-регулирующие вспомогательные вещества, включая, без ограничения, фосфатные буферы в концентрации 0,5-1,0 мМ, изотонические растворы, включая, без ограничения, хлорид натрия в концентрации 50-150 мМ, и консерванты, включая, без ограничения, тиомерсал. Вакцины по настоящему изобретению превосходят зарегистрированные вакцины на основе RBD белка S вируса SARS-CoV-2 в качестве антигена, по трем характеристикам, особенно важным в контексте текущей пандемии, а именно по кинетике и интенсивности выработки антигена; аффинности антител и способности нейтрализовать вирусы; и клеточному ответу Th-1 типа.

Пути введения

Вакцины против SARS-CoV-2 на основе RBD-димера и OMV менингококка группы В вводят во время лечения внутримышечно или подкожно в дозе RBD от 5 до 50 мкг, предпочтительно 10-20 мкг, и дозе OMV от 20 до 50 мкг в виде двух инъекций с интервалом 21-28 дней. Эти вакцины могут содержать минеральную соль, включая, без ограничения, гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция в концентрациях от 500 до 2500 мкг, предпочтительно от 500 до 1000 мкг.

Эти составы вводят по схеме, состоящей из одной-трех доз с интервалом 21-28 дней.

ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1. Ингредиенты вакцинных составов: А) аминокислотная последовательность RBD белка S: остатки 319-541; В) размер частиц декластеризованных OMV, определенный с помощью DLS; и С) титры IgG-антител к RBD, индуцированные у мышей BALB/c, иммунизированных двумя партиями RBD, приготовленными в OMV/Al(OH)₃, произведенными в соответствии с надлежащей производственной практикой (GMP).

Фиг. 2. Титры IgG-антител к RBD, индуцированные через семь дней после иммунизации RBD-димером, приготовленным в OMV/Al(OH)₃ или в Al(OH)₃. Буквы обозначают статистически значимое различие ($p \leq 0,5$).

Фиг. 3. Титры IgG-антител к RBD через семь дней после иммунизации RBD-димером, приготовленным в OMV/Al(OH)₃, по сравнению с RBD-мономером, приготовленным в Al(OH)₃. Буквы обозначают статистически значимое различие ($p \leq 0,5$).

Фиг. 4. Кинетика IgG-антител к RBD, индуцированных разными вакцинными композициями RBD-димера, приготовленного в OMV/Al(OH)₃, по сравнению с RBD-мономером, приготовленным в Al(OH)₃. Буквы обозначают статистически значимое различие ($p \leq 0,5$).

Фиг. 5. Индекс avidности (%) анти-RBD антител, индуцированных RBD-димером, приготовленным в OMV/Al(OH)₃, по сравнению с RBD-мономером, приготовленным в OMV/Al(OH)₃.

Фиг. 6. Ингибирование RBD-ACE2 взаимодействия антителами, индуцированными у мышей BALB/c, иммунизированных RBD-димером, приготовленным в OMV/Al(OH)₃.

Фиг. 7. А) Продукция IFN γ и IL-4 (пг/мл) клетками селезенки у мышей,

иммунизированных RBD-димером в OMV/Al(OH)₃ и повторно стимулированных RBD in vitro, по данным количественного ИФА. Буквы обозначают статистически значимое различие ($p \leq 0,5$) по критерию Тьюки; В) Соотношение изотипов IgG2a/IgG1 в качестве показателя индукции ответа по Th-1 типу.

ПРИМЕРЫ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Пример 1. Составы вакцин против SARS-CoV-2

Получали два состава, содержащих в качестве антигена RBD-димер с последовательностью, приведенной на фиг. 1А, в концентрации 10-20 мкг, декластеризованные OMV с размером частиц от 150 до 300 нм в концентрации 20-40 мкг, и гидроксид алюминия в качестве адьюванта в концентрации 500 мкг.

OMV осаждали этанолом и экстрагировали, как описано в CU 21888A1. Массу осадка OMV взвешивали, гомогенизировали в воде и полностью растворяли путем механического встряхивания (в течение приблизительно одного часа) при температуре окружающей среды. После растворения OMV раствор проверяли на отсутствие частиц и/или мутности, после чего выполняли процесс декластеризации в ультразвуковой ванне при температуре $\leq 10^\circ\text{C}$ путем обработки ультразвуком. В конце декластеризации отбирали образцы для определения размеров частиц OMV методом DLS (фиг. 1В). В ходе этого процесса следует контролировать размер частиц в пределах 150-300 нм. Декластеризованные OMV хранили при температуре 2-8°C.

Смесь RBD и декластеризованных OMV (OMV-RBD) гомогенизировали путем легкого встряхивания (при 100-300 об/мин) в течение 15 минут.

Наконец, OMV-RBD смешивали с гидроксидом алюминия, и составы фильтровали, при этом указанные выше параметры поддерживали в течение 0,5-1 часа. Состав хранили при температуре 2-8°C.

Составы RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ (фиг. 1С), полученные в соответствии с надлежащей производственной практикой (фиг. 1С), вызывают у мышей BALB/с гуморальный ответ в виде анти-RBD IgG-антител, более сильный, чем у животных, получивших лечение плацебо (без вакцинного антигена).

Пример 2. В отличие от состава RBD-димера в Al(OH)₃, состав RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ индуцирует ранний гуморальный ответ у мышей BALB/с

Мышей BALB/с иммунизировали внутримышечно в нулевой момент времени 0,1 мл одного из следующих составов:

- Группа 1: 10 мкг RBD-димера, смешанного с 20 мкг некластеризованных OMV, соабсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
 - Группа 2: 10 мкг RBD-димера, соабсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
 - Группа 3: 20 мкг некластеризованных OMV, абсорбированных в 800 мкг Al(OH)₃;
- и
- Группа 4: 800 мкг Al(OH)₃.

Группы 3 и 4 служили в качестве отрицательного контроля.

Кровь брали в нулевой момент времени и в день 7 после иммунизации. Сыворотку

иммунизированных животных тестировали методом непрямого ИФА для определения титров анти-RBD антител. 96-луночные планшеты для ИФА Nunc MaxiSorp™ с высокой способностью связывать белок покрывали 50 мкл RBD в концентрации 3 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере для покрытия, pH 9,6, и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Планшеты трижды промывали раствором для очистки. Непокрытые участки блокировали 100 мкл 5% блокирующего раствора на основе обезжиренного молока в течение одного часа при 37°C, после чего выполняли еще одну стадию промывки, как описано выше. Добавляли серийные разведения сыворотки в фосфатном буфере, 1% BSA, pH 7,2, (1:3) обычно начиная от исходного уровня 1/50, по 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C и снова промывали. Затем добавляли 50 мкл разведения антимышиного IgG-антитела, конъюгированного с пероксидазой, в регулирующем фосфатном буферном растворе (pH 7,2), 1% BSA (1:5000) с последующей инкубацией в течение одного часа. После последней промывки наносили раствор субстрата фермента пероксидазы (50 мкл/лунку). После последующей инкубации в темноте в течение 20 минут реакцию останавливали добавлением 2N H₂SO₄ в количестве 50 мкл/лунку. Поглощение измеряли при 450 нм с помощью ридера для ИФА Multiskan EX (Thermo Scientific). Титр IgG определяли в виде обратной величины разведения сыворотки каждого отдельного животного, который в четыре раза превышал значение средней абсорбции сыворотки до иммунизации (T₀) при разведении 1:50. Для анализа и представления результатов вычисляли Log₁₀ титра для каждого отдельного животного. Для определения животных с ответной реакцией логарифмический титр >1,70 принимали за пороговое значение, соответствующее разведению сыворотки >1:50. Для животных, титр которых был ниже предела обнаружения анализа, устанавливали значение титра, равное 25, и значение log₁₀, равное 1,4.

На фиг. 2 показан ранний гуморальный ответ в виде IgG-антител, индуцированных составом группы 1, который содержал RBD-димер в OMV/Al/(OH)₃, и составом группы 2, который содержал RBD-димер в Al/(OH)₃. Через семь дней после иммунизации гуморальный ответ, индуцированный RBD, у 9 из 10 мышей, иммунизированных составом, содержащим RBD-димер в OMV/Al(OH)₃, был значительно выше (p<0,05, однофакторный анализ ANOVA и тест множественного сравнения Тьюки) чем у животных, иммунизированных составом, содержащим RBD-димер в Al(OH)₃. Это различие связано с иммуностимулирующей способностью OMV, присутствующих в составе группы 1.

Пример 3. В отличие от состава RBD-мономера в OMV/Al(OH)₃, состав RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ индуцирует ранний гуморальный ответ у мышей BALB/c

Мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно в нулевой момент времени 0,1 мл одного из следующих составов:

- Группа 1: 10 мкг RBD-димера, смешанного с 20 мкг некластеризованных OMV, соабсорбированного в 800 мкм Al(OH)₃;
- Группа 2: 10 мкг RBD-димера, соабсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;

- Группа 3: 10 мкг RBD-мономера, смешанного с 20 мкг некластеризованных OMV, абсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
 - Группа 4: 10 мкг RBD-мономера, абсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
 - Группа 5: 20 мкг некластеризованных OMV, абсорбированных в 800 мкг Al(OH)₃;
- и
- Группа 6: 800 мкг Al(OH)₃.

Группы 5 и 6 служили в качестве отрицательного контроля.

Процедура сбора крови и оценки сыворотки была такой же, как в примере 2.

На фиг. 3 показан ранний гуморальный ответ в виде IgG-антител, индуцированных составами, которые содержат RBD-димер в OMV/Al(OH)₃, по сравнению с составами, которые содержат RBD-мономер в той же смеси. Через семь дней после иммунизации у мышей, которым вводили состав группы 1, содержащий RBD-димер в OMV/Al(OH)₃, гуморальный ответ на RBD был значительно выше ($p \leq 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ и тест множественного сравнения Тьюки) чем у мышей с составом группы 3, содержащим RBD-мономер в той же смеси. Это свойство объясняется более сильной иммуногенностью димера по сравнению с мономером.

Пример 3. После введения двух доз RBD, димеризованный в OMV/Al(OH)₃, демонстрирует высокую иммуногенность у мышей

Мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно двумя дозами вакцины; т.е. в нулевой момент времени и через 14 дней 0,1 мл одного из следующих составов:

- Группа 1: 3 мкг RBD-димера, смешанного с 20 мкг некластеризованных OMV, соабсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
- Группа 2: 10 мкг RBD-димера, смешанного с 20 мкг некластеризованных OMV, соабсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
- Группа 3: 3 мкг RBD-димера, абсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
- Группа 4: 10 мкг RBD-димера, абсорбированного в 800 мкг Al(OH)₃;
- Группа 5: 20 мкг некластеризованных OMV, абсорбированных в 800 мкг Al(OH)₃;
- Группа 6: 800 мкг Al(OH)₃.

Группы 5 и 6 служили в качестве отрицательного контроля.

Кровь для получения сыворотки брали в дни 0, 7, 14, 21 и 28; другими словами, сыворотку до иммунизации, а также через 7 и 14 дней после каждой инъекции. Этот график иммунизации использовали для двух целей: сравнить 3 мкг и 10 мкг дозы RBD-димера в составе с OMV/Al(OH)₃ и с Al(OH)₃ и оценить кинетику образования антител, индуцированных этими составами.

Анти-RBD антитела оценивали методом ИФА, как описано в примере 2.

Как показано на фиг. 4, состав, содержащий RBD-димер в OMV/Al(OH)₃, запускает дозозависимую кинетику, которая резко возрастает после второй дозы. Однако существенные различия между составом RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ и составом RBD-димера в Al(OH)₃ после введения второй дозы вакцины не наблюдаются. Титры антител в дни 21 и 28 были высокими для обоих составов: 10^4 - 10^6 .

Пример 5: Аффинность антител, индуцированных составом RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ и составом RBD-димера в Al(OH)₃

Для оценки аффинности индуцированных антител определяли их avidность, создавая препятствия для реакции антиген-антитело путем добавления хаотропного агента тиоцианата аммония (NH₄SCN). Планшеты покрывали 50 мкг RBD (3 мкг/мл) в карбонатно-бикарбонатном буфере для покрытия с pH 9,6 и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Затем планшеты трижды промывали раствором для очистки; непокрытые участки блокировали 100 мкл 5% блокирующего раствора на основе обезжиренного молока в течение одного часа при 37°C. Добавляли сыворотки (в разведениях, дающих значение поглощения в методе ИФА, равное приблизительно 1). Участки инкубировали при 37°C в течение одного часа с последующим добавлением 2М NH₄SCN в течение 15 минут при температуре окружающей среды. Процедуру продолжали, как описано в примере 2.

Avidность показывает процент IgG-антител, которые остаются связанными с антигеном после обработки хаотропным агентом. Эту avidность рассчитывают по следующей формуле: (титр IgG с титром IgG/NH₄SCN и без NH₄SCN)*100. Считается, avidность антитела считается хорошей, если она больше 50%. Уровень avidности определяют только для животных с ответной реакцией (титр >1,70), определенный методом ИФА.

Как показано на фиг. 5, антитела, индуцируемые составом RBD в OMV/Al(OH)₃, обладают более высокой аффинностью ($p \leq 0,05$), чем антитела, индуцируемые RBD-димером в Al(OH)₃, что указывает на более высокое качество иммунного ответа, индуцируемого составами по настоящему изобретению.

Пример 6. Функциональная активность анти-RBD антител, индуцированных RBD-димером в составе OMV/Al(OH)₃

Взаимодействие RBD-ACE2 ингибируется индуцированными антителами

Сыворотку, полученную в день 28 от мышей, иммунизированных, как описано в примере 2, подвергали ИФА для определения ингибирования взаимодействия RBD-ACE2.

Планшеты для ИФА покрывали мышинным ACE-Fc (5 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,6) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем планшеты трижды промывали раствором для очистки. непокрытые участки блокировали 200 мкл 2% блокирующего раствора на основе обезжиренного молока в течение одного часа при 37°C. Получали человеческий RBD-Fc (40 нг/мл, pH 7,2, содержащий 2% молока). Сыворотки от мышей до иммунизации и иммунизированных мышей готовили в разведениях от 1:25 до 1:400. В качестве отрицательного контроля использовали нерелевантный белок, человеческое анти-PDL1-F антитело.

Разведенную сыворотку предварительно инкубировали с человеческим RBD-Fc в соотношении 1:1 при 37°C в течение 1 ч, наносили на планшет (50 мкл/лунку), инкубировали при 37°C в течение 1,30 ч и один раз промывали.

После еще одного этапа промывки 50 мкл человеческих IgG-антител

конъюгировали с щелочной фосфатазой в фосфатном буфере с pH 7,2, содержащем 2% молока (1:1000), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После последней промывки добавляли PNPP (1 мг/мл) в диэтаноламиновом буфере (50 мкл/лунку). Планшет инкубировали в темноте в течение 20 мин, и реакцию останавливали добавлением 3M NaOH (50 мкл/лунку). Поглощение при 405 нм определяли с помощью ридера для ИФА. Ингибирование вычисляли по следующей формуле: $(1 - \text{Abs}_{405 \text{ нм RBD Fc человека}} / \text{Abs}_{405 \text{ нм RBD Fc человека}}) * 100$. На фиг. 6А показана способность сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных составом по настоящему изобретению, ингибировать взаимодействие RBD-ACE2.

Нейтрализующая способность анти-RBD антител, вырабатываемых против вируса SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2-нейтрализующую способность сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных по схеме, описанной в примере 2, оценивали в колориметрическом анализе с использованием нейтрального красного. Клетки Vero E6 культивировали в чашках с MEM+2% фетальной телячьей сыворотки, 25 mM/мл L-глутамин, 2 мкг/мл бикарбоната, 80 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл амфотерицина В. Супернатант удаляли, и в каждую лунку добавляли 100 мкл PBS, pH=7,2, содержащего 0,02% нейтрального красного. Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Раствор нейтрального красного отбрасывали. Монослой клеток дважды промывали PBS, 0,05% Tween 20. В каждую лунку добавляли по 100 мкл лизирующего раствора (50 частей абсолютного этанола, 49 частей сверхчистой воды и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Планшет инкубировали при температуре окружающей среды в течение 15 минут, и оптическую плотность измеряли при 540 нм. Наибольшее разведение сыворотки со значением оптической плотности выше порогового значения считали нейтрализующим титром. Пороговое значение вычисляли как половину значения средней оптической плотности контрольных лунок, покрытых клетками. В анализе нейтрализации вируса была продемонстрирована нейтрализующая способность сыворотки, индуцированная составом RBD-димера в OMV/Al(OH)₃. Титр нейтрализации 1:640 достигался в среднем на 28 день после иммунизации, как показано на фиг.6В.

Пример 7. Клеточный иммунный ответ Th-1 типа, определенный по индуцированному IFN γ и соотношению IgG2a/IgG1

Клеточный иммунный ответ у мышей, которые были ранее инокулированы в соответствии с графиком, описанным в примере 2, оценивали в сыворотке, извлеченной в день 28. Выделяли спленоциты мышей BALB/c, иммунизированных составом RBD-димера в OMV/Al(OH)₃ или составом RBD-димера в Al(OH)₃, которые стимулировали *in vivo* в присутствии RBD (5 мкг/мл). Концентрация клеток составляла 1×10^6 клеток/мл. IL-4 и IFN γ определяли в супернатанте культуры методом количественного ИФА через 72 часа после стимуляции.

Как показано на фиг. 7А, RBD-димер в OMV/Al(OH)₃ индуцирует более высокие уровни IFN γ , чем RBD-димер в Al(OH)₃. Реакция Т-клеток была смещена в сторону

ответа IgG по типу Th-1. Отношение IgG2a/IgG1 было выше для RBD-димера в OMV/Al(OH)₃, чем для RBD-димера в Al/(OH)₃; что свидетельствует о смещении ответа в сторону Th-1 типа.

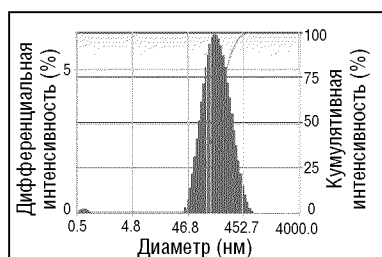
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция, индуцирующая иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2, отличающаяся участком рецептор-связывающего домена белка S вируса SARS-CoV-2 в качестве антигена, везикулами наружной мембраны бактерии *Neisseria meningitidis* группы B (OMV) в качестве иммуностимулирующего компонента, и адъювантом.
2. Вакцинная композиция по п.1, где антиген имеет последовательность SEQ ID NO. 1.
3. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-2, где RBD находится в форме димера.
4. Вакцинная композиция по п.3, где димер образован посредством дисульфидных мостиков между двумя свободными цистеинами (C538).
5. Вакцинная композиция по п.1, где адъювант выбирают из следующей группы:
 - гидроксид алюминия;
 - фосфат алюминия; и
 - Фосфат кальция.
6. Вакцинная композиция по п.1, где везикулы наружной мембраны (OMV) *Neisseria meningitidis* группы B, используемые в качестве иммуностимулирующего компонента, имеют размер частиц в диапазоне от 150 до 300 нм.
7. Вакцинная композиция по п.1, где диапазон доз RBD составляет от 5 до 50 мкг.
8. Вакцинная композиция по п.1, которая дополнительно содержит фармацевтически подходящие эксципиенты.
9. Способ получения OMV по п.6, включающий следующие стадии:
 - а) OMV солибилизируют в воде фармацевтической чистоты путем встряхивания; и
 - б) OMV обрабатывают ультразвуком при температуре ниже 10°C.
10. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 1-8 для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2.
11. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 1-8 для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2, где для индукции специфических антител к вирусу необходимо семь дней после иммунизации.
12. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 1-8 для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2, где требуется ответ нейтрализующих антител и клеточный ответ Th-1 типа после введения двух доз.
13. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 1-8 для индукции гуморального ответа против вируса SARS-CoV-2 посредством внутримышечного введения RBD в диапазоне доз от 5 до 50 мкг и OMV *N. meningitidis* в диапазоне доз от 10 до 100 мкг в схеме иммунизации, состоящей из одной-трех доз.

ФИГ.1

A) RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASF
STFKCYGVSPTKLNLCFTNVEYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT
GCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQAGSTPCNGVEG
FNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCV
NF

B)



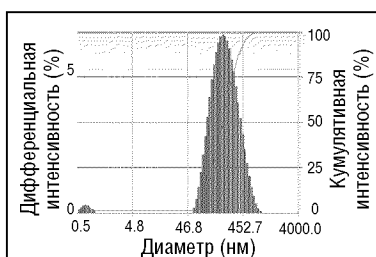
Результаты распределения (Contin)

Пик	Диаметр (нм)	Ст. отк.
1	0.7	0.1
2	173.9	97.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Среднее	172.7	97.7

Кумулянты Результаты

Диаметр(d): 141.7 (нм)

Индекс полидисперсности (P.I.): 0.244



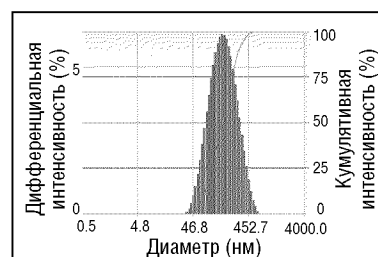
Результаты распределения (Contin)

Пик	Диаметр (нм)	Ст. отк.
1	0.7	0.1
2	246.1	137.3
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Среднее	242.3	139.5

Кумулянты Результаты

Диаметр(d): 189.7 (нм)

Индекс полидисперсности (P.I.): 0.200



Результаты распределения (Contin)

Пик	Диаметр (нм)	Ст. отк.
1	181.1	101.5
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
Среднее	181.1	101.5

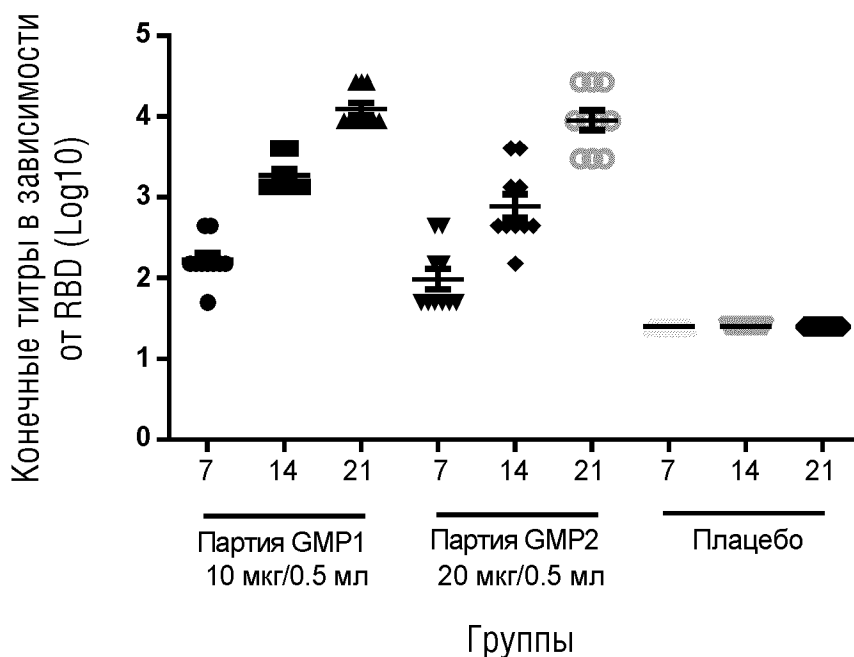
Кумулянты Результаты

Диаметр(d): 152.2 (нм)

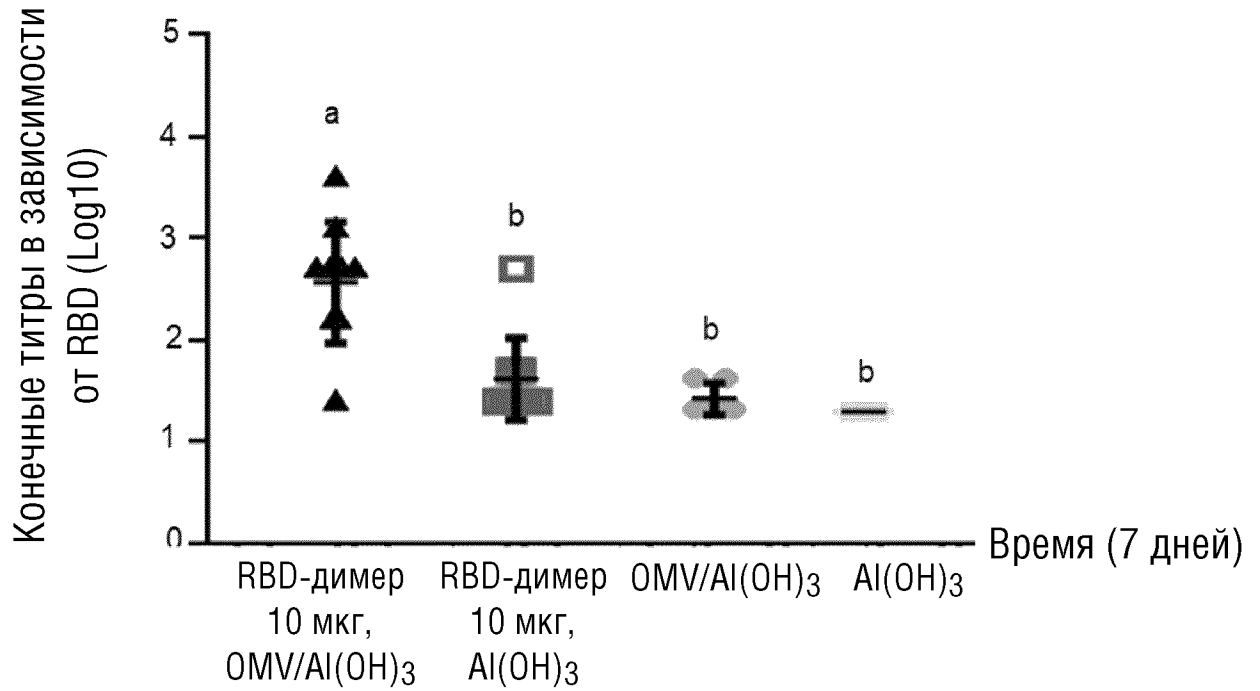
Индекс полидисперсности (P.I.): 0.236

C)

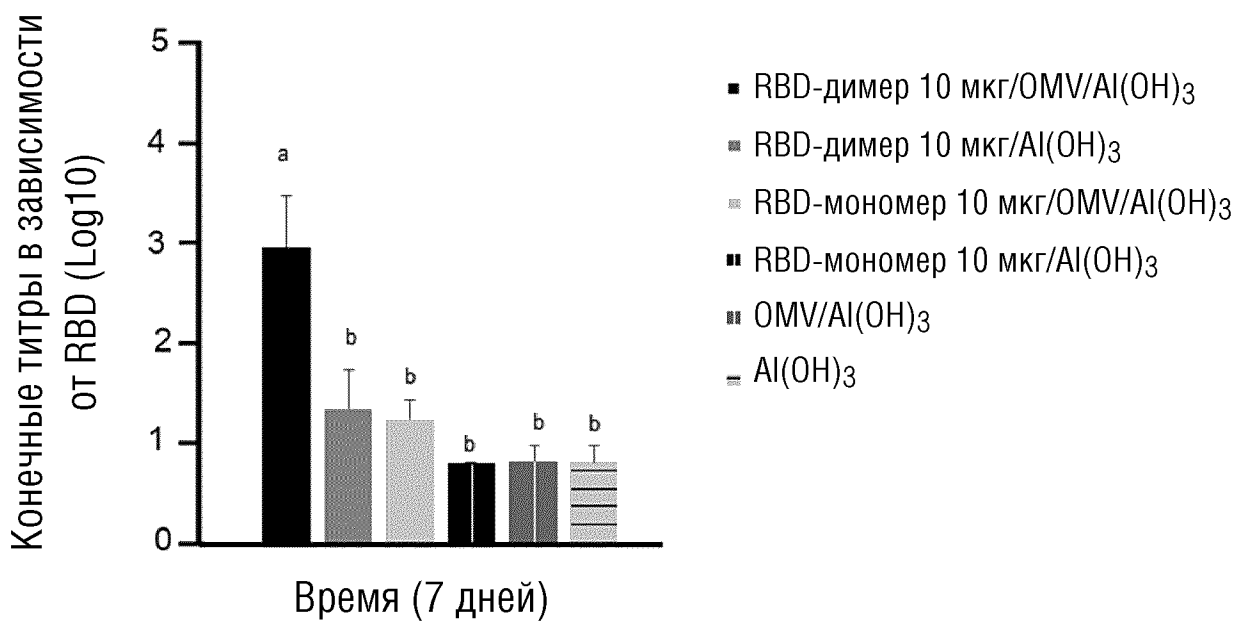
IgG в зависимости от RBD (GMP партии)



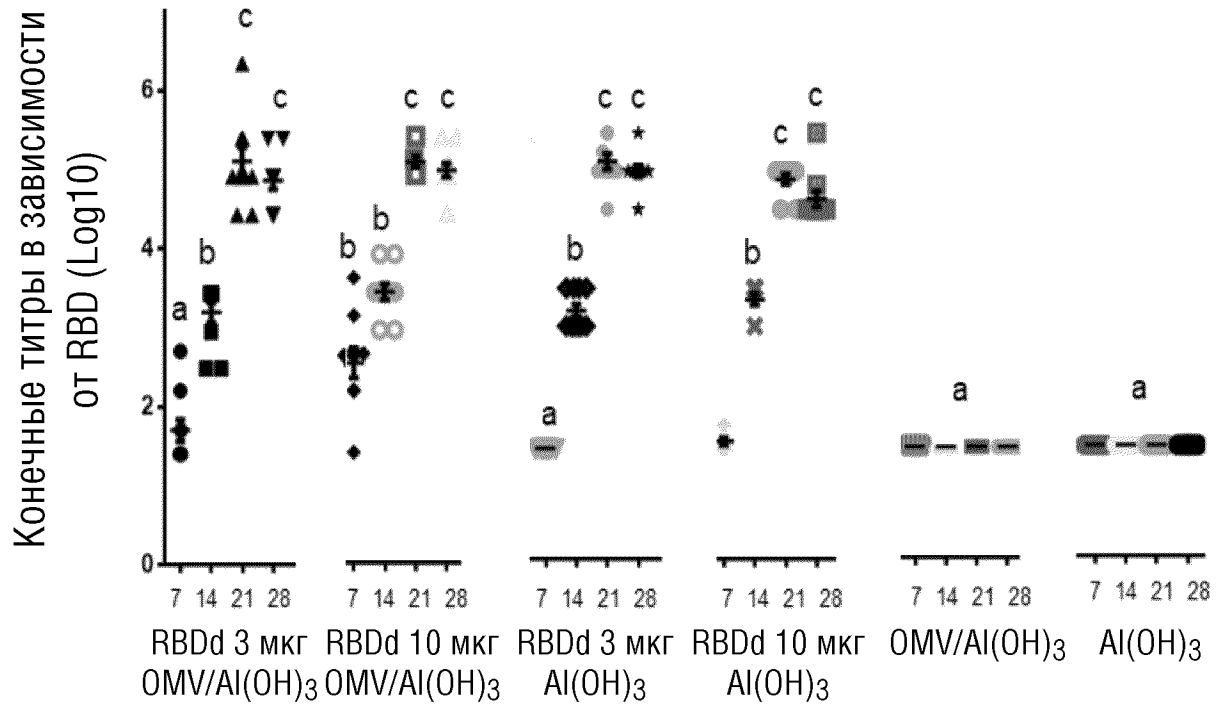
ФИГ.2



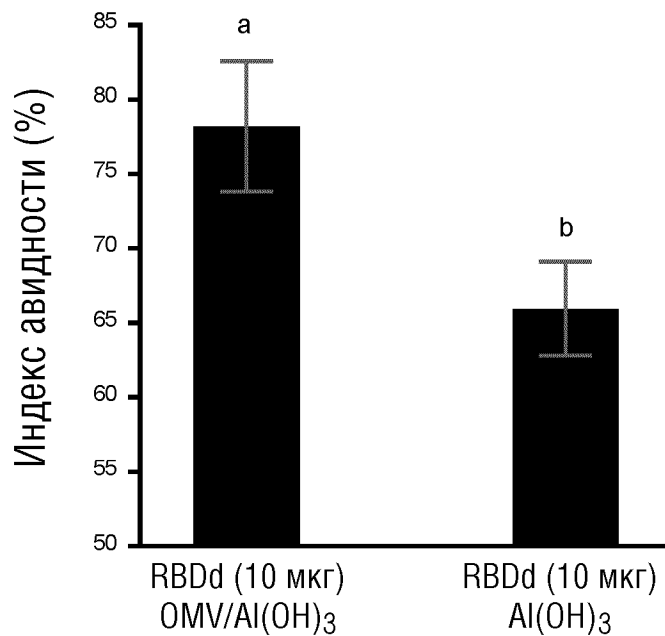
ФИГ.3



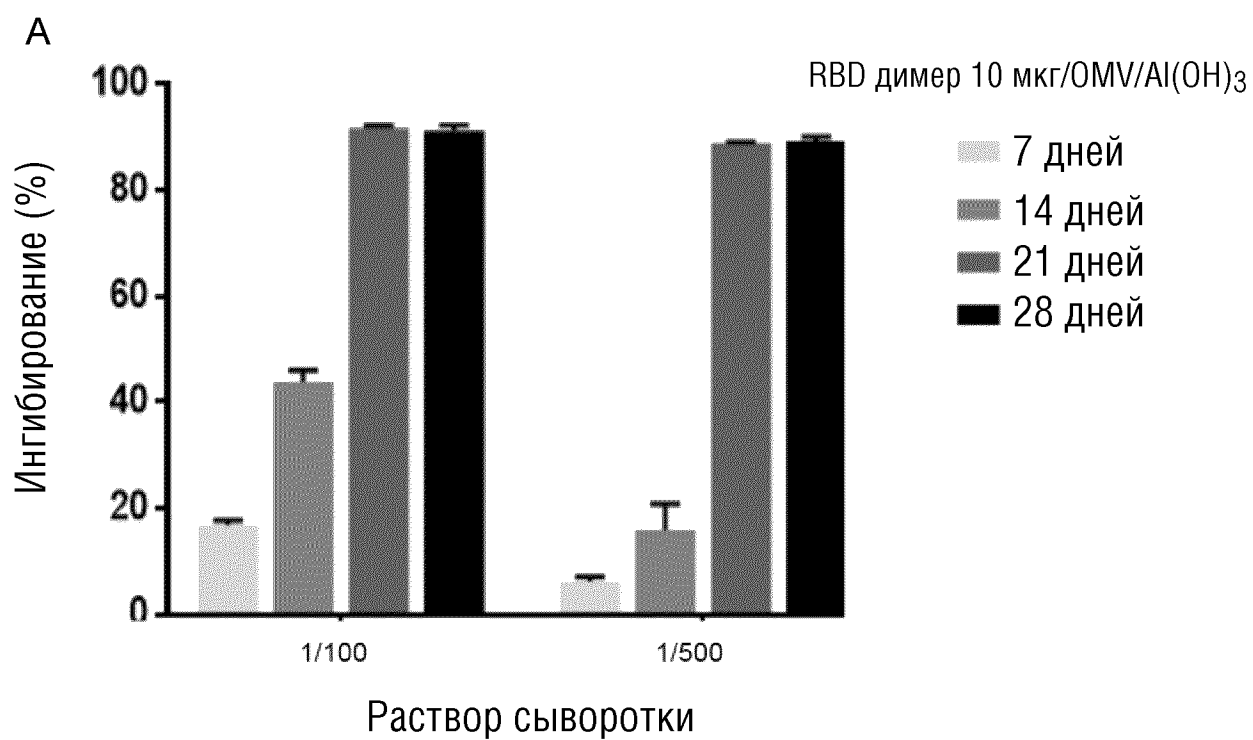
ФИГ.4



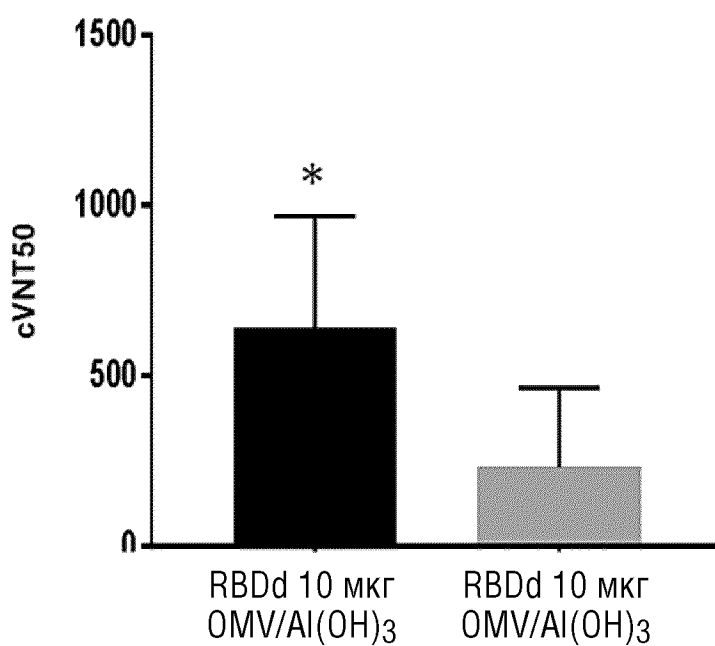
ФИГ.5



ФИГ.6



В



ФИГ.7

