

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391773** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.14

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИННЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-CoV-2 ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЗАЩИТНОГО ИММУНИТЕТА**

(31) **2020-0101**

(32) **2020.12.16**

(33) **CU**

(86) **PCT/CU2021/050014**

(87) **WO 2022/127946 2022.06.23**

(71) Заявитель:

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

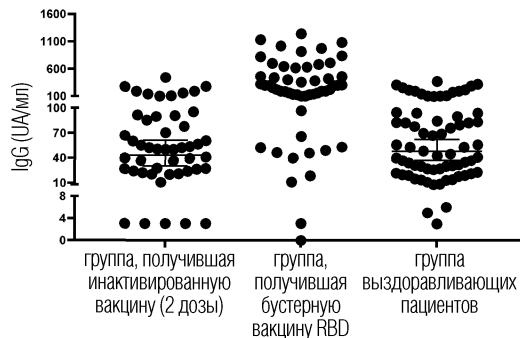
(72) Изобретатель:

**Верес Бенкомо Висенте Гильермо,
Вальдес Балбин Юрий, Гарсия Ривера
Дагмар, Очоа Аззе Роландо, Климент
Руис Янет, Гонсалес Родригес
Умберто, Ороса Васкес Иветте,
Диас Эрнандес Марианнис, Санчес
Рамирес Белинда, Охито Магас
Эдуардо, Леон Монсон Калет, Масиас
Абрахам Консуэло Милагро, Чанг
Монтеагудо Артуро, Порто Гонсалес
Делиа Эстер, Дубед Эчеверриа Марта,
Родригес Акоста Мирейда (CU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и медицины. Оно относится к применению вакцинных композиций на основе рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 в лечении пациентов, выздоровевших от COVID-19, и субъектов, вакцинированных с использованием вакцинных платформ, отличных от субъединичных вакцин, у которых не развился эффективный защитный иммунитет или у которых иммунитет со временем ослаб и которым не рекомендована ревакцинация той же вакциной, которая использовалась в первичной вакцинации. В частности, это применение описано для вакцинных композиций, содержащих ковалентный конъюгат рецептор-связывающего домена (RBD) и белка-носителя, такого как столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин и мутант дифтерийного анатоксина CRM197, где вакцинные композиции содержат RBD в качестве антигена с или без иммуностимуляторных везикул наружной мембраны серогруппы B *Neisseria meningitidis*.



A1

202391773

202391773

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578501EA/032

ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИННЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-COV-2, ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЗАЩИТНОГО ИММУНИТЕТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и медицины, в частности, к применению вакцинных композиций на основе рецептор-связывающего домена SARS-COV-2 в лечении пациентов, выздоровевших от COVID-19, и вакцинированных субъектов, у которых не развился защитный иммунитет, а также у которых выраженный естественный защитный гуморальный ответ ослаб или не был индуцирован.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

COVID-19 является совсем недавно возникшим заболеванием, обнаруженным в Ухане, Китай, в декабре 2019 года, когда появились сообщения о серьезных случаях пневмонии неизвестной этиологии. Заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2, характеризуется быстрым распространением и появлением у симптоматических пациентов, составляющих менее 50%, таких симптомов, как лихорадка, кашель, ринорея, боль в горле и одышка. У остальных инфицированных людей заболевание протекает бессимптомно, что является ключевым фактором распространения вируса и представляет собой эпидемиологическую проблему с точки зрения борьбы с ним (отчеты ВОЗ о ситуации с коронавирусом (COVID-2019). <https://www.who.int/emergency/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Проверено 13 августа 2020 г.).

Другие коронавирусы, похожие на SARS-CoV-2, известные как MERS и SARS, уже вызывали аналогичные эпидемии в предыдущие десятилетия. SARS демонстрирует высокий уровень гомологии с SARS-CoV-2, и одним из основных сходств является использование этими двумя вирусами белка ACE2 в качестве рецептора для проникновения в клетки человека. Таким образом, как в случае SARS, так и в случае SARS-CoV-2 решающим фактором заражения человека вирусом является взаимодействие между рецептор-связывающим доменом (RBD) вирусного белка S1 и белком ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) (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 из примерно 195 аминокислот (последовательность 333-257), который содержит рецептор-связывающий мотив (RBM) и представляет собой область взаимодействия вируса с рецептором ACE2. RBD содержит 4 внутримолекулярных дисульфидных мостика между цистеинами Cys336-Cys361, Cys379-Cys432, Cys391-Cys525 и Cys480-Cys488, благодаря чему он имеет очень компактную и стабильную структуру (Lan et al (2020), Nature <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>).

RBD является малой молекулой, молекулярная масса которой варьирует в пределах от 25 до 27 кДа в зависимости от экспрессирующего хозяина и включенных углеводов, в

основном связанных с аспарагинами N331 и N343 (Chen WH et al, 2017, Journal of Pharmaceutical Sciences 106: 1961-1970).

Стратегии создания вакцин против SARS-CoV-2 включают инактивированный вирус, генетические конструкции, содержащие генетический материал вируса, включенный в аденовирус или в виде информационной РНК, а также вакцины на основе субъединиц или фрагментов вирусного белка, экспрессируемых в генетически модифицированных хозяевах. В этом случае предпочтительной молекулой является белок S, также известный как белок Spike, или фрагмент его структуры, т.е. RBD. Их главным преимуществом является безопасность, поскольку эта стратегия ближе к стратегии многих используемых вакцин; тем не менее, ее главной задачей является достижение иммунного ответа, достаточного для защиты от вирусной инфекции.

По состоянию на 2 декабря 2020 года 163 вакцины-кандидата против SARS-CoV-2 находились на стадии доклинической оценки и 51 - на стадии клинических испытаний. Среди них имеются как минимум 13 вакцин-кандидатов (5 на стадии клинических испытаний и 8 на стадии доклинических испытаний) на основе RBD в качестве специфического антигена (ПРОЕКТ вакцин-кандидатов против COVID-19-2 декабря 2020 г., доступен по адресу: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>).

Влияние COVID-19 на иммунную систему пациентов стало более понятным спустя несколько месяцев после начала пандемии. Заболевание, особенно на тяжелой и критической стадиях, имеет сильный гипервоспалительный компонент, запускающий цитокиновый шторм (de la Rica, R; Borges M; Gonzalez-Freire, M (2020) Front. Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.558898>; Riva et al. (2020) Critical Care. 24:549), который может способствовать летальному исходу, если его не контролировать должным образом. (Tisoncik, J et al. (2012) Microbiology and Molecular Biology. 76(1):16-32). Фактически, для этой цели ведется разработка нескольких препаратов, и некоторые из них включены в протоколы лечения COVID-19 на Кубе (Martínez et al. (2020) Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. 10(2) <http://www.revistaccuba.sld.cu>, консультации 2 декабря 2020 г.) и в мире (Xu, X et al. (2020) Military Medical Research. 7:22).

Более того, несколько исследований показали, что анти-RBD антитела нейтрализуют SARS-CoV-2 у пациентов, выздоровевших от заболевания (выздоровливающих). У разных людей уровни антител различаются, при этом существует определенная корреляция между их титрами и тяжестью заболевания (у бессимптомных пациентов он ниже, чем у пациентов с умеренным, тяжелым или критическим заболеванием). (Seow, J et al. (2020) Nature Microbiology doi: 10.1038/s41564-020-00813-8; Воšnjak, B et al. (2020) Cell Mol Immunol. doi: 10.1038/s41423-020-00573-9). Также было документально подтверждено, что титр анти-RBD антител у выздоравливающих индивидуумов сильно коррелирует с их способностью нейтрализовать вирусной инфекции SARS-CoV-2 в клетках *in vitro* (Tan, C et al. (2020) Nature Biotechnology <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>).

Тем не менее, недавние исследования показали, что титр анти-RBD антител и их способность нейтрализовать SARS-CoV-2 зависят от времени и постепенно снижаются у людей, выздоровевших от инфекции. (Lee, W et al. (2020) *The Journal of Infectious Diseases*, DOI: 10.1093/infdis/jiaa673). Кроме того, появляется все больше сведений о случаях повторного заражения пациентов, и даже имеются случаи, когда второе заражение протекало тяжелее первого (Qu, YM и Cong HY (2020) *Travel Med Infect Dis.* 34:101619; Lan L et al. (2020) *JAM.* 323:1502-3; Tillet, R et al. (2020) *Lancet Infect Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30764-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30764-7)). Эти данные привлекли внимание международного научного сообщества к необходимости разработки стратегии их эффективной защиты. (Overbaugh, J (2020) *Nature*, 26, 1678-1685).

Учитывая тот факт, что при столкновении иммунной системы выздоравливающих от SARS-CoV-2 с вирусными антигенами в очень своеобразном (*sui-generis*) иммунологическом контексте не является очевидным, что вакцины или стратегии вакцинации, разработанные для защиты наивных людей, не контактировавших с вирусом, являются подходящими или эффективными для достижения или усиления защиты от повторного заражения, не вызывая при этом непреднамеренных побочных эффектов, таких как реактивация цитокинового шторма или стимуляция выработки антител, вызывающих явление, известное как ADE (антителозависимое усиление) (Arvin, AM et al. (2020) *Nature* 584(7821):353-363). Кроме того, продолжительность индуцированной защиты, обеспечиваемой различными вакцинными технологиями, используемыми для лечения COVID-19, не известна, и в случае необходимого проведения ревакцинации некоторые из этих вакцин нельзя будет использовать в качестве бустер-вакцины.

В настоящем изобретении впервые описано применение вакцинных композиций на основе рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 для лечения пациентов, выздоровевших от COVID-19, у которых защитный гуморальный ответ ослаб или не был индуцирован. Кроме того, эти вакцинные композиции можно использовать у лиц, ранее вакцинированных аденовирусной вакциной или РНК-вакциной. Описанные вакцинные композиции, находящиеся на стадии тестирования на неинфицированных людях, в настоящее время впервые демонстрируют способность к эффективной повторной стимуляции у выздоравливающих пациентов сильного нейтрализующего иммунного ответа. Тот факт, что обе вакцинные стратегии основаны на рекомбинантном малом белке RBD вируса SARS-CoV-2 может обеспечить особое преимущество в этой области применения. В частности, они вызывают узконаправленную реакцию против RBM, который отвечает за взаимодействие вируса с рецептором ACE2 в клетках-хозяевах. Эта узконаправленная реакция с удовлетворительным профилем безопасности является преимуществом по сравнению с другими стратегиями вакцинации, такими как аттенуированные вирусные вакцины, вакцины на основе S-белка или вирусные векторные вакцины.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к

применению вакцинных композиций, содержащих рецептор-связывающий домен (RBD) вируса SARS-CoV-2, в лечении выздоровевших от COVID-19 пациентов. В частности, эти выздоровевшие пациенты имеют гуморальный иммунитет, характеризующийся по меньшей мере одним из следующих состояний: титр анти-RBD антител составляет менее 1:1000, ингибирующая способность взаимодействия RBD-ACE2 составляет менее 50% в разведении 1:100, или титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 составляет менее 1:160.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вышеупомянутому применению вакцинных композиций, характеризующихся тем, что они содержат ковалентный конъюгат RBD с белком-носителем, выбранным из группы, состоящей из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина и мутанта дифтерийного анатоксина CRM197. Другими вакцинными композициями в формуле изобретения являются композиции, содержащие адсорбированный на $Al(OH)_3$ RBD в качестве антигена либо в мономерной, либо в димерной форме. Другие заявленные вакцинные композиции содержат применение иммуностимуляторов, таких как везикулы наружной мембраны *Neisseria meningitidis*.

В конкретном варианте осуществления вышеуказанные вакцинные композиции вводят выздоровевшим от COVID-19 пациентам внутримышечно или подкожно по схеме иммунизации, включающей от одной до трех доз от 1 до 100 мкг RBD с интервалами от 21 до 28 дней. Настоящее изобретение предназначено для применения по приведенному выше графику иммунизации для получения гипериммунной плазмы с высокой способностью нейтрализовать SARS-CoV-2.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению представленных в настоящем описании вакцинных композиций в иммунизации субъектов, вакцинированных с использованием вакцинных платформ, отличных от субъединичных вакцин, и у которых не развился эффективный защитный иммунитет или у которых этот защитный иммунитет со временем ослаб, и которым не рекомендована ревакцинация той же вакциной, которая использовалась при первичной иммунизации, такой как аденовирусная, инактивированная вирусная, аттенуированная вирусная вакцина и мРНК-вакцина. Согласно настоящему изобретению эффективный защитный иммунитет достигается при наличии по меньшей мере одного из следующих условий: титр анти-RBD антител превышает 1:1000, ингибирующая способность взаимодействия белка RBD-ACE2 превышает 50% в разведении 1:100, или титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 превышает 1:160.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении описано применение вакцинных композиций на основе рецептор-связывающего домена вируса SARS-CoV-2 у выздоровевших (выздоровливающих) от COVID-19 пациентов, не имеющих значительных уровней природных анти-RBD антител с нейтрализующей способностью. В частности, эти вакцинные композиции могут содержать димерные и/или мономерные формы RBD,

адсорбированного на $Al(OH)_3$, с иммуностимулятором или без него, или могут быть более сложными, как подробно описано во включенных, но не ограничивающих, заявках на патент CU-2020-0057 и CU-2020-0069.

Для применения у выздоравливающих пациентов с COVID-19 необходима проверка выполнения по меньшей мере одного из следующих условий: титр анти-RBD антител составляет менее 1:1000 по данным ELISA, или титр антител, нейтрализующих инфекционность SARS-CoV-2, составляет менее 1:160 по результатам анализа живых вирусов или псевдовирусов, или по данным конкурентного ELISA способность ингибировать белок взаимодействия RBD-ACE2 составляет менее 50% в разведении сыворотки 1:100.

Вакцинные препараты индуцируют активацию иммунного ответа памяти к вирусу, обеспечивая высокие титры анти-RBD антител, преимущественно с нейтрализующей способностью в течение нескольких месяцев (не менее 6 месяцев). Если титры пациента снова снижаются, можно ввести дополнительную бустерную дозу для восстановления защиты. Учитывая широкий диапазон безопасности, вакцинные препараты можно вводить несколько лет подряд, от 2 до 5 лет. Кроме того, вакцинные композиции, упомянутые в настоящем изобретении, можно использовать для иммунизации субъектов, вакцинированных с использованием вакцинных платформ, отличных от субъединичных вакцин, у которых не развился эффективный защитный иммунитет, или у которых иммунитет ослаб и требуется бустерная доза. Было документально подтверждено, что субъекты могут быть иммунизированы с использованием вакцинных платформ на основе аденовирусного вектора только один или два раза, поскольку после первой инъекции вырабатываются антитела к самому аденовирусному вектору, которые могут сделать вторую дозу неэффективной (Casimiro, DR et al. (2003) *J. Virol.*, 77:7663-7668).

Вакцинные препараты вводят выздоравливающим пациентам внутримышечно или подкожно по схеме иммунизации, включающей от одной до трех доз от 1 до 100 мкг RBD, предпочтительно от 30 до 60 мкг с интервалами от 21 до 28 дней.

Настоящее изобретение также относится к способу получения гипериммунной плазмы, обладающей способностью нейтрализовать вирус SARS-CoV-2, из антител, продуцируемых выздоравливающими пациентами с COVID-19 после вакцинации. Гипериммунная плазма полезна для лечения пациентов с умеренным, тяжелым или критическим течением COVID-19, о чем указывают несколько авторов (Bloch EM et al. (2020) *J Clin Invest.* 130:2757-65, Casadevall A. (2020) *JAMA.* 324:455-7). В соответствии с рекомендациями FDA (Администрация по контролю за продуктами питания и лекарствами в системе Министерства здравоохранения и социальных служб США) доноры не должны иметь симптомов, должны иметь отрицательный результат ПЦР-теста на SARS-CoV-2 в реальном времени и титр нейтрализующих антител не менее 1:160 согласно рекомендациям FDA (Администрация по контролю за продуктами питания и лекарствами в системе Министерства здравоохранения и социальных служб США. *Investigational COVID-19 convalescent plasma: guidance for industry.* Rockville, MD: FDA,

2020). Способ по изобретению позволяет получить гипериммунную плазму выздоравливающих пациентов, у которых не был сгенерирован спонтанно хороший иммунный ответ. С этой целью выздоравливающих пациентов иммунизируют в соответствии с представленной в настоящем описании схемой иммунизации до тех пор, пока не будет достигнут желаемый уровень нейтрализующих антител (титры >1:160) для получения гипериммунной плазмы, пригодной для пассивного переноса антител к SARS-CoV-2. Плазма, которая будет использоваться в этом способе, будет обработана в соответствии со стандартами обработки крови для таких целей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1. Корреляция между общими титрами обнаруженных анти-RBD антител IgG и значениями ингибирования (в процентах) для сывороток в разведении 1:100.

Фиг. 2. А: Процент ингибирования взаимодействия RBD-ACE2 в сыворотке субъектов через шесть месяцев после окончания схемы иммунизации мРНК-вакциной и после применения бустерной дозы вакцины RBD. В: Концентрация анти-RBD антител, обнаруженных у субъектов, иммунизированных инактивированной вирусной вакциной, получивших бустерную дозу вакцины RBD.

Фиг. 3. Концентрация анти-RBD антител, обнаруженных у субъектов, иммунизированных вакциной RBD, получивших бустерные дозы вакцины конъюгированного RBD.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Вариабельность титров анти-RBD антител и ингибирующей способности взаимодействия RBD-ACE2 у кубинских пациентов, выздоровевших от COVID-19.

Сыворотку, полученную от 39 выздоравливающих пациентов с COVID-19, анализировали с помощью непрямого ELISA для определения титра анти-RBD антител. 96-луночные микротитровальные планшеты NUNC MaxiSorp покрывали 50 мкл RBD в концентрации 5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,0), инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Непокрытые участки блокировали 150 мкл блокирующего раствора (PBS, Tween 20 0,05% [об:об], 4% обезжиренного молока) в течение 30 минут при 37°C. Затем добавляли сыворотку, растворенную в блокирующем растворе (100 мкл/лунку), в серийных разведениях (1:2), обычно начиная с 1:100. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C и трижды промывали PBS, Tween 20 (0,05%) [об:об]. Разведение конъюгированного с пероксидазой человеческого антииммуноглобулина G (100 мкл) добавляли в блокирующий раствор (1:5000) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После заключительного этапа промывки добавляли раствор субстрата фермента пероксидазы (100 мкл/лунку). Инкубацию выполняли в темноте в течение 20 минут, и реакцию останавливали 2N H₂SO₄ (50 мкл/лунку). Поглощение считывали при 490 нм с помощью считывающего устройства ELISA. Титр IgG рассчитывали с помощью линейной регрессии в оцениваемом диапазоне разведений с последующей интерполяцией. Пороговое значение в два раза превышало

среднее поглощение отрицательной сыворотки, полученной до COVID-19, в разведении 1:100.

Сыворотку тех же 39 выздоравливающих пациентов оценивали с помощью ELISA для определения ее способности ингибировать взаимодействие RBD-ACE2. Планшеты, покрытые человеческим ACE2-Fc (5 мкг/мл), блокировали, и в продукт слияния RBD-Fc мыши добавляли сыворотку выздоравливающих пациентов в разведениях от 1:100 до 1:10000, предварительно инкубированную в течение 1 часа при 37°C. Для обнаружения распознавания использовали конъюгат антитела к мышинному IgG с щелочной фосфатазой, разведенный в молоке 0,2% и SSTF-T. После заключительного этапа промывки наносили 50 мкл/лунку pNPP в диэтаноламиновом буфере (1 мг/мл), инкубировали в темноте в течение 30 минут, и реакцию останавливали 3М NaOH (50 мкл/лунку). Поглощение считывали при 405 нм. Процент ингибирования вычисляли по следующей формуле: $(1 - \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ RBD-Fc мыши} + \text{сыворотка выздоравливающих} / \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ RBD-Fc мыши}) * 100$ [где Abs_{405nm} означает поглощение при 450 нм].

На фиг. 1 показана ингибирующая способность сывороток выздоравливающих пациентов (n=39) в разведении 1:100 в зависимости от титра анти-RBD антител. Между общими титрами анти-RBD антител и их ингибирующей способностью наблюдается положительная корреляция Спирмена ($r=0,9178$). Из всех протестированных индивидуумов у 41% показатели ингибирования были ниже 30%, а титры анти-RBD антител были ниже 1:800.

Высокая вариабельность, наблюдаемая у кубинских выздоравливающих пациентов, как в титрах анти-RBD антител, так и в их способности ингибировать взаимодействие RBD-ACE2, согласуется с данными, представленными в литературе (Tan, C et al. (2020) Nature Biotechnology <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>). Литературные данные также подтверждают, что у выздоравливающих пациентов с COVID-19 наблюдается положительная корреляция между титром анти-RBD IgG и способностью сыворотки/плазмы нейтрализовать инфекцию, вызванную живым вирусом. Только высокие титры анти-RBD антител (более 1:1350) являются индикаторами более высокой вероятности (80%) нейтрализующей способности в разведении 1:160. (Salazar, E et al. (2020) bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.06.08.138990>).

Пример 2. Выздоровливающие пациенты с COVID-19, у которых не развился эффективный гуморальный иммунитет, приобретают защиту после иммунизации.

У двух выздоровевших пациентов с COVID-19 брали образцы крови через 2 и 4 месяца после отрицательного теста RT-PCR на выявление SARS-CoV-2. Сыворотку тестировали на титр анти-RBD антител и способность ингибировать взаимодействие RBD-ACE2 с помощью ELISA, описанного для таких целей в примере 1, а также на титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 с помощью колориметрического анализа интенсивности нейтрального красного, описанного в заявке на патент CU-2020-0069. Вышеуказанные методы подробно описаны в заявках на патенты CU-2020-0057 и CU-2020-0069.

После подтверждения, что титр анти-RBD антител и титр нейтрализующих антител в обоих случаях ниже параметров, установленных для защитного ответа, обоих пациентов иммунизировали 50 мкг димерного RBD, адсорбированного на $Al(OH)_3$. В день 14 после иммунизации собирали кровь. В полученной сыворотке снова определяли титр анти-RBD антител, ингибирующую способность взаимодействия RBD-ACE2 и титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2.

В таблице 1 показаны результаты определений у двух пациентов, выполненных в нулевой день (до иммунизации) и в день 14 после иммунизации. Как можно отметить, после однократной иммунизации оба пациента имели высокие титры анти-RBD антител, показатели ингибирования взаимодействия RBD-ACE2 превысили 80%, и титры нейтрализующих антител превысили 1:160. Важно отметить, что рост нейтрализующих титров превышает рост титров анти-RBD антител, что доказывает, что данная иммунизация преимущественно обогащает сыворотку/плазму антителами с нейтрализующей способностью.

Таблица 1. Результаты у выздоравливающих пациентов с COVID-19 до и после иммунизации.

	Титр анти-RBD антител			Ингибирующая способность взаимодействия RBD-ACE2		Титр нейтрализующих антител		
	T0	T14	Рост	T0	T14	T0	T14	Рост
Время (день)								
Субъект 1	1/800	1/12800	x16	48%	95%	1/54	1/2560	x47
Субъект 2	1/400	1/3200	x8	35%	96%	1/40	1/3162	x79

Также важно подчеркнуть, что у обоих пациентов отмечен удовлетворительный профиль безопасности. Никаких существенных нежелательных явлений не наблюдалось.

Пример 3. Увеличение концентрации анти-RBD антител и способности ингибировать взаимодействие RBD-ACE2 у субъектов, ранее иммунизированных инактивированной и мРНК-вакциной и получивших бустерные дозы вакцинной композиции, содержащей RBD.

У субъектов после завершения полной схемы с двумя дозами инактивированной или мРНК вирусной вакцины через шесть месяцев брали кровь для оценки продолжительности ответа, вызванного предыдущей вакцинацией. Эти субъекты получили дозу вакцинных композиций на основе RBD вируса SARS-COV, и после бустерной дозы между 14 и 28 днями у них определяли концентрации анти-RBD антител и способность ингибировать взаимодействие ACE2 с белком RBD.

На фиг. 2 показана ингибирующая способность сывороток, полученных от индивидуумов, вакцинированных мРНК-вакциной и получивших бустерную дозу вакцинной композиции, содержащей адсорбированный на $Al(OH)_3$ RBD с везикулой

внешней мембраны *Neisseria meningitidis* (фиг. 2а). Как можно видеть, после шести месяцев лечения по полной схеме значения ингибирования были ниже 65%, а после иммунизации бустерной дозой эти значения превысили 90% для всех оцениваемых субъектов.

Аналогичное увеличение наблюдается при введении вакцинной композиции, содержащей адсорбированный на $Al(OH)_3$ RBD, субъектам, ранее иммунизированным двумя дозами инактивированной вирусной вакцины. Сыворотки оценивали через 21 день после получения инактивированной вирусной вакцины по полной схеме, при этом наблюдаемые значения концентрации анти-RBD антител составляли в среднем 40 UA/мл, которые после применения бустерной дозы увеличились до более чем 200 UA/мл.

В обоих случаях была продемонстрирована способность усиливать ранее существовавший иммунитет путем введения дозы ранее вакцинированным субъектам.

Пример 4. Увеличение концентрации анти-RBD антител у субъектов, ранее иммунизированных вакциной RBD, которые получили бустерные дозы вакцинной композиции, содержащей конъюгированный столбнячный анатоксин.

Субъекты, иммунизированные двумя дозами вакцины-кандидата на основе RBD, через 6 месяцев получали стимулирующую дозу вакцинной композиции, содержащей ковалентный конъюгат RBD и столбнячного анатоксина в качестве белка-носителя. Как можно видеть на фиг. 3, у всех субъектов наблюдалось увеличение концентрации антител после бустерной дозы вакцинной композиции, содержащей конъюгированный RBD.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение вакцинной композиции, содержащей рецептор-связывающий домен (RBD) вируса SARS-CoV-2, в лечении выздоровевших от COVID-19 пациентов.

2. Применение по п.1, где выздоровевшие пациенты имеют гуморальный иммунитет, характеризующийся по меньшей мере одним из следующих состояний:

- титр анти-RBD антител составляет менее 1:1000,

- ингибирующая способность взаимодействия белка RBD-ACE2 составляет менее 50% в разведении 1:100 или

- титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 составляет менее 1:160.

3. Применение по п.1, где вакцинная композиция характеризуется тем, что она содержит ковалентный конъюгат RBD и белка-носителя, выбранного из группы, состоящей из:

- столбнячного анатоксина,

- дифтерийного анатоксина и

- CRM197.

4. Применение по п.1, где вакцинная композиция характеризуется адсорбированным на $Al(OH)_3$ RBD в качестве антигена.

5. Применение по п.4, отличающееся тем, что вакцинная композиция дополнительно содержит иммуностимулятор.

6. Применение по п.5, характеризующееся использованием везикул наружной мембраны *Neisseria meningitidis* в качестве иммуностимулятора.

7. Применение по п.4, где RBD находится в форме мономера.

8. Применение по п.4, где RBD находится в форме димера.

9. Применение по любому из пп. 1-8, где вакцинные композиции вводят внутримышечно или подкожно выздоровевшим пациентам по графику иммунизации, содержащему от одной до трех доз от 1 до 100 мкг RBD с интервалами от 21 до 28 дней.

10. Применение по п.9 для получения гипериммунной плазмы с высокой способностью нейтрализовать SARS-CoV-2.

11. Применение вакцинной композиции, содержащей RBD SARS-CoV-2, для обеспечения эффективного защитного иммунитета у субъектов, ранее иммунизированных вакцинами, выбранными из группы, состоящей из:

- аденовирусной вакцины,

- инактивированной вирусной вакцины,

- аттенуированной вирусной вакцины,

- вакцины на основе мРНК

12. Применение по п.11, где защитный иммунитет считается эффективным при выполнении по меньшей мере одного из следующих условий:

- титр анти-RBD антител составляет более 1:1000,

- ингибирующая способность взаимодействия RBD-ACE2 превышает 50% в разведении 1:100, или

- титр нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 превышает 1:160.

13. Применение по п.11, где вакцинная композиция характеризуется ковалентным конъюгатом RBD и белка-носителя, выбранного из группы, состоящей из:

- столбнячного анатоксина,
- дифтерийного анатоксина и
- мутанта дифтерийного анатоксина
- CRM197.

14. Применение по п.11, где вакцинная композиция характеризуется адсорбированным на $Al(OH)_3$ RBD в качестве антигена.

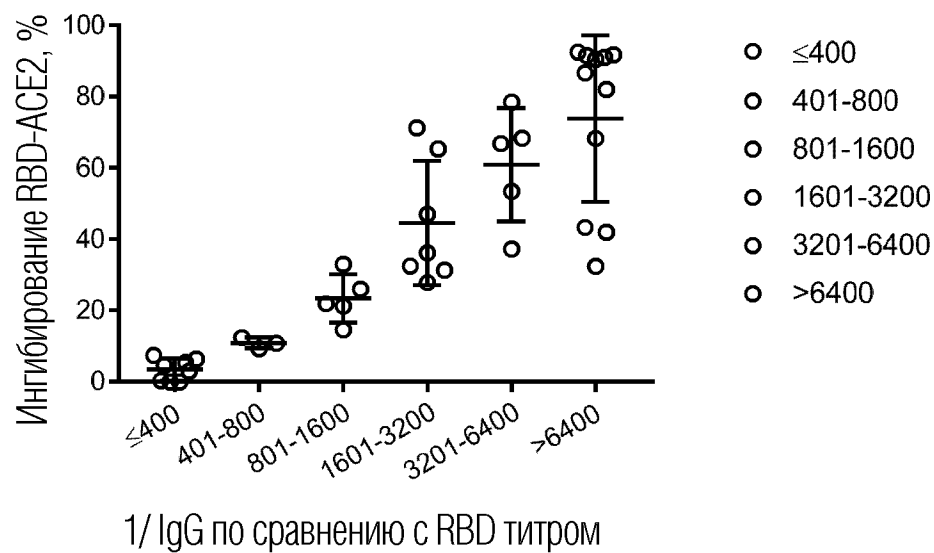
15. Вакцинная композиция по п.14, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит иммуностимулятор.

16. Вакцинная композиция по п.15, отличающаяся тем, что она содержит везикулу наружной мембраны *Neisseria meningitidis* в качестве иммуностимулятора.

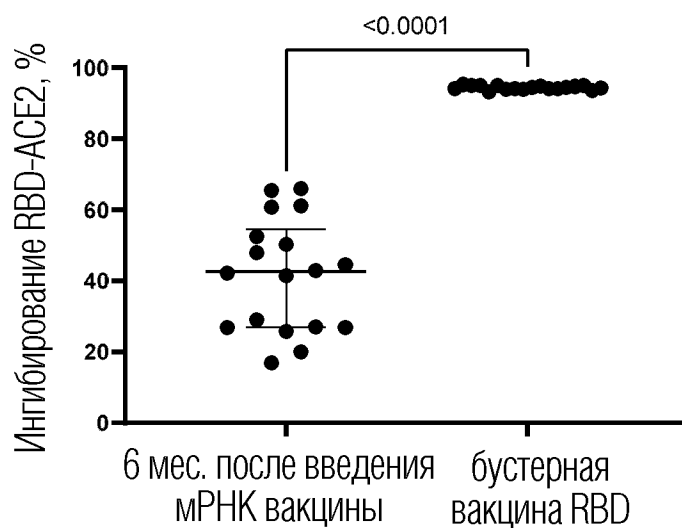
17. Применение по п. 14, где RBD находится в форме мономера.

18. Применение по п. 14, где RBD находится в форме димера.

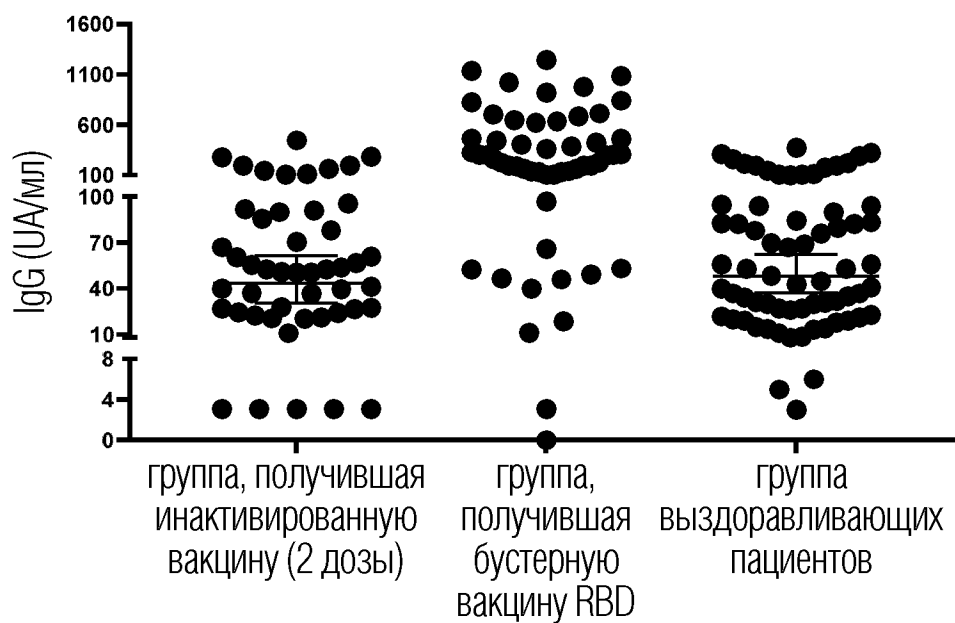
ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 3

