

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047981**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.07</p> <p>(21) Номер заявки
202390189</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2021.07.01</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 38/21</i> (2006.01)
<i>A61K 39/02</i> (2006.01)
<i>A61K 39/12</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>C12N 15/20</i> (2006.01)
<i>C12N 15/62</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61P 31/04</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01)</p> |
|---|---|

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

- | | |
|---|--|
| <p>(31) 202010623708.8; 202110353488.6</p> <p>(32) 2020.07.01; 2021.03.31</p> <p>(33) CN</p> <p>(43) 2023.03.06</p> <p>(86) PCT/CN2021/103931</p> <p>(87) WO 2022/002180 2022.01.06</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНСТИТУТ ОФ БАЙОФИЗИКС,
ЧАЙНИЗ АКАДЕМИ ОФ
САЙЕНСИЗ (CN)</p> <p>(72) Изобретатель:
Фу Янсинь, Пэн Хуа, Сунь Шинюй
(CN)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) US-A1-2019225673
CN-A1-104403004
US-A1-2010261248
(CHEN, Xinyun et al.). "IgG-Fc (Advances in Research on Ig G-Fc Fusion Proteins)" (Chinese Journal of Biologicals), Vol. 28, No. 11, 30 November 2015 (2015-11-30), pages 1223-1227, see abstract, page 1226, left-hand column, last paragraph
Qing-Tong Wang et al. "Effect of rhTACI-Ig fusion protein on antigen-specific T cell responses from keyhole limpet haemocyanin challenged mice", Molecular Immunology, Vol. 49, No. 1-2, 02 October, 2011 (2011-10-02), pages 380-386, see abstract</p> |
|---|--|

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

B1**047981****047981 B1**

Область, к которой относится изобретение

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

Предпосылки к созданию изобретения

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

Сезонный грипп вызывает тяжелые заболевания у 1-4 миллионов человек и ежегодно убивает 200000-500000 человек^[5]. Лучшим способом профилактики и борьбы с гриппом является вакцинация, которая снижает заболеваемость и снижает тяжесть инфекции, особенно у детей младшего возраста и пожилых людей, подверженных высокому риску осложнений гриппа. Несмотря на то что одобренные в настоящее время вакцины против гриппа обеспечивают хороший защитный эффект у здоровых молодых людей, все еще есть некоторые проблемы, которые необходимо решить. Например, производство некоторых вакцин зависит от куриных эмбрионов, например инактивированных вакцин против гриппа и аттенуированных вакцин против гриппа. Недостатком этих вакцин является то, что, если преобладающие штаммы вируса имеют происхождение от домашней птицы, эпидемия заболевания приведет к увеличению потребности в вакцинах и куриных эмбрионах, что приведет к дефициту поставки куриных эмбрионов^[6]. Другим недостатком является то, что производство этих вакцин требует огромного количества времени. Пожилые люди более склонны к тяжелым синдромам вируса гриппа, а стандартные вакцины, как правило, неэффективны для пожилых людей, чья иммунная система с возрастом постепенно ослабевает^[7]. Учитывая проблемы, с которыми сталкиваются современные противогриппозные вакцины, в связи с распространенностью вирусов гриппа существует острая необходимость в противогриппозной вакцине, которая обладает сильной иммуногенностью, не зависит от куриных эмбрионов и может быть получена быстро.

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

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

экспрессии хемокиновых рецепторов после воздействия на DC, способствуя, таким образом, активации Т-клеток [22, 23]. В последнее время все больше и больше исследований показывают, что интерферон I типа можно использовать в качестве иммуноадьюванта. В исследовании Le Bon et al. было показано, что, когда мышей иммунизировали слабым иммуногеном, интерферон I типа проявлял сильный иммуноадьювантный эффект у мышей и индуцировал долгоживущие антитела и иммунную память [24], также автором было обнаружено, что основными клеточными популяциями, в которых интерферон I типа проявлял свой эффект, были DC-клетки. В то же время антитела используются для направленной доставки вакцин к DC, чтобы стимулировать активацию и функции кросс-презентации DC, что еще больше повысит активность и эффективность вакцин.

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

Сущность изобретения

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, используемый в вакцине по настоящему изобретению, может представлять собой, например, мутантный целевой антиген, который является отличным от дикого типа. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, описанный в настоящей заявке, может представлять собой, например, мутанты опухолевых антигенов и/или антигенов патогенов, например вирусных или бактериальных антигенов. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген может представлять собой, например, полноразмерный или S1 область S белка вируса

SARS-COV-2, например, целевой антиген может представлять собой антиген, показанный в SEQ ID NO.76 или SEQ ID NO.77. В настоящем изобретении целевой антиген дикого типа означает вирусы или другие инфекционные агенты, кодируемые генами дикого типа, или иммуногенные белки, экспрессируемые опухолями (ген дикого типа относится к наиболее распространенному аллелю в природе, и часто используется в качестве контрольного стандартного гена в биологических экспериментах), например, спайковый белок (S белок), полученный из исходного штамма SARS-CoV-2 дикого типа. В настоящем изобретении мутантный целевой антиген (мутант) относится к мутантным вирусным белкам, экспрессируемым мутантными вирусными штаммами и кодируемым мутантными генами, происходящими из генов дикого типа, например, точечные мутации S белка в различных мутантных SARS-CoV-2, которые были обнаружены, включают: делецию 69-70, делецию Y144, делецию 242-244, мутацию L18F, D80A, D215, R246I в области NTD, и мутацию K417, E484, N501Y, мутацию L452R, мутацию T478K, мутацию D614G, H655Y в области RBD. Например, эти точечные мутации существуют в разных комбинациях в британских мутантных штаммах SARS-CoV-2 B.1.1.7 (Альфа), южноафриканских мутантных штаммах B.1.351 (Бета), бразильских мутантных штаммах P1 (Гамма), индийских мутантных штаммах B. 1.617, B. 1.617.1 (Каппа), B. 1.617.2 (Дельта), B. 1.617.3, калифорнийских мутантных штаммах B. 1.429 и других мутантных штаммах. В некоторых вариантах отсутствия мутантные целевые антигены могут включать, например, естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечением, искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечением, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образованные мутациями, при этом целевой антиген может представлять собой опухолевый антиген, антиген патогена, такой как вирусный (например, SARS-COV-2) или бактериальный антиген. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген, используемый в вакцине по настоящему изобретению, представляет собой мутантный вирусный антиген, например, мутантный вирусный антиген может представлять собой мутант SARS-COV-2, включающий, например, естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечением, искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/мутацию с добавлением/усечением, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образованные мутациями, полученные из белка SARS-COV-2 (такие как один или более из S белка, N белка, М белка, Е белка); например, мутантный вирусный антиген может представлять собой мутант полноразмерного S белка, S1 области и RBD области; например, мутантный вирусный антиген может включать одну или несколько из следующих мутаций в S белке SARS-COV-2: делеция 69-70, делеция Y144, делеция 242-244, мутация L18F, D80A, D215, R246I в области NTD, мутация K417, E484, N501Y, мутация L452R, мутация T478K, мутация D614G, H655Y в области RBD; например, мутантный вирусный антиген может включать мутации, присутствующие в британском мутантном штамме B.1.1.7 (Альфа), южноафриканском мутантном штамме B.1.351 (Бета) и бразильском мутантном штамме P1 (Гамма), индийских мутантах B. 1.617, B. 1.617.1 (Каппа), B. 1.617.2 (Дельта), B. 1.617.3 и калифорнийском мутанте B. 1.429; например, мутантный вирусный антиген может содержать мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80 и SEQ ID NO.81; мутантный вирусный антиген может содержать мутант, включающий последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82, SEQ ID NO.83 и SEQ ID NO.84. В настоящей заявке, если определено не указано иное или явно не ограничивается контекстом, целевой антиген в настоящем изобретении, как правило, включает целевые антигены дикого типа и мутантные целевые антигены.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (1) Конструируют вектор экспрессии, включающий ген, кодирующий слитый белок или вакцинную платформу; предпочтительно вектор экспрессии представляет собой вектор экспрессии рEE12.4;
- (2) Конструируют клетку-хозяин, включающую вектор экспрессии, путем транзientной трансфекции; предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой клетку 293F;
- (3) Клетки-хозяева культивируют и собирают клеточный супернатант;
- (4) Слитый белок или вакцинную платформу очищают аффинной колоночной хроматографией с белком A/G.

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение включает любые возможные мутанты указанного антигена вакцины на основе слитого белка, включая естественную точечную мутацию/делеционную мутацию/усечение, любую комбинацию естественных мутаций, подтипы, образованные мутациями, и мутантные последовательности, включающие искусственную точечную мутацию/делеционную мутацию/усечение, сконструированные для усиления эффекта вакцины, такие как SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82, SEQ ID NO. 83, SEQ ID NO.84.

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

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

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

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

3. Вакцинная платформа IFN-опухолевый или вирусный антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело), обеспечиваемая настоящим изобретением, экспрессируется эукариотической системой экспрессии на основе клеток HEK293, и белки, экспрессируемые клетками HEK293, ближе к молекулам природного белка либо по молекулярной структуре, либо по физико-химическим характеристикам и модификации белков и биологическим функциям белков.

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Последовательности индивидуальных компонентов.

SEQ ID NO.1: Аминокислотная последовательность мышинного mIFN α 4 (mIFN α)

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFSTKDLSATWNLTLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVRTYFHRITVYLRKKKHSKAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKE

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
SILAVRKYFRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

SEQ ID NO.2: Аминокислотная последовательность человеческого IgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVLSVLSLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
HV

SEQ ID No.23: Fc-hole гетеродимера

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVLSVLSLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No.24: Fc-knob гетеродимера

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAA

SEQ ID NO.4: Аминокислотная последовательность Линкера 1:

GGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO.25: Аминокислотная последовательность Линкера 2:

GSGSGS

SEQ ID NO.5: Аминокислотная последовательность сигнального пептида:

MARLCAFLMILVMMSYYWSACSLG

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

MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPIKDHWP
AANQVGVGAFGPGLTTPPHGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRD
SHPQA

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

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
GLGFTPPHGGLLGWSPQAQGIQLTPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQA

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

MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSP
TSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPSTTTSTG
PCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWEWASVRFWSLSLLVPF
VQWVFGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLLPIFFCLWVYI

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

MENITSGLLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLSFLGEAPVCLGQNSQSP
TRNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTG
PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPF
VQWVFGLSPTVWLSAIWMIWYWGPSLYSIVCPFTPLLQIFCCLWVFI

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

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQSSQSP
TSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTG
PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWEWASARFWSLSLLVP
FVQWVFGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

SEQ ID NO.9: Аминокислотная последовательность HA гриппа:

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDSHNGKLCRLKGIAPLQLGK
CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSPKLNKSYVNNKKGKEVLV
LWGIHHPNSKEQQNL YQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYYWT
LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
NIHPVTIGECPKYVRSKLRMVTGLRNNPSIQSR

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

MHGDTPTLHEYMLDLQPETDLICYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICSKQP

2. Последовательности в составе содержащей мышиный IFN вакцины mIFN α -антиген-Fc:
SEQ ID NO.11: Аминокислотная последовательность mIFN α -Pres1-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNA TL L DSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVR TYFH RITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGR TMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDA
NKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNT
HPQAFEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDV SHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSP
GKHV

SEQ ID NO.12: Аминокислотная последовательность mIFN α -RBD (SARS-CoV-2)-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNA TL L DSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVR TYFH RITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGR TRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVAD
YSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTN VYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYR LFRKSNLKP FERDISTEIQAGSTPCNG
VEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN
FFEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGKH
V

SEQ ID NO.13: Аминокислотная последовательность mIFN α -HA-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNA TL L DSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVR TYFH RITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGR TD TICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLED SHNGKLCRLK
GIAPLQLGKCN IAGWLLGNPECDPLL P VRSWSYIVETP NSENGICYPGDFIDYEELREQLS
SVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSH EGKSSFYRNLLWL TEKEGSYPKLN SYVN
KKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSN YNRRFTPEIAERP KVRDQAG
RMNYYWTL LKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTK CQTPLGA
INSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDFLYSK
LTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGKHV

SEQ ID NO.14: Аминокислотная последовательность mIFN α -E7 (HPV)-Fc в гомодимере

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNA TL L DSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVR TYFH RITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGR TMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQA
EPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR TLEDLLMGT LGIVCPICSQKPFEEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGKHV

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

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNLTLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
AVRITYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
GGGGGGGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

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

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
GLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLNPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
VIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDSSHNGKLCRLKGIAPLQLGK
CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLV
LWGIHHPNSKEQQNL YQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYYWT
LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

MHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI
VTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

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

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNAATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPD
 WDFNPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQ
 TGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

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

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNAATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASV
 YAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEVQR
 IAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRFRKSNLKPFERDI
 STEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGP
 KKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNH
 YHTQKSLSLSPGK

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

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNAATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN
 LLEDSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICY
 PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTE
 KEGSYPKLNSYVNKKGKEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRF
 TPEIAERPKVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNA
 SMHECNTKCTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRSKLRMVTGLRNNPSIQSRFED
 KTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNH
 YHTQKSLSLSPGK

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

CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
 LVLRDLTQQILNLFTSKDLSATWNAATLLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSLL
 AVRTYFHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKEGGGGSGGGG
 SGGGGSRTAKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLND
 SSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIV
 CPICSQKPFEDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNH
 YHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.33: Аминокислотная последовательность первой цепи mIFN α -Fc-hole в гетеродимере
 CDLPHTYNLGNKRALTVLEEMRRLPPLSCLKDRKDFGFPLEKVDNQIQKAQAI
 LVLRLDTQQILNLFTSKDLSATWNLTLDSFCNDLHQQLNDLKACVMQEPPLTQEDSL
 AVRIFYHRITVYLRKKKHSLCAWEVIRAEVWRALSSSTNLLARLSEEKESGGGGSGGG
 GSGGGSGGGGRDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
 NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGR
 QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
 NRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPG
 QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEI
 YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
 NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 LSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLD
 SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF
 IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
 YPKLKNYSYVNNKKGKEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIA
 ERPKVRDQAGRMNYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
 CNTKQOTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRSAKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
 EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTLGIVCPICS
 QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO.38: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pres1-Fc в гомодимере
 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
 SGGGSRMTMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA
 GAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAF
 EDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVLSVLEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
 SGGGSRTRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYN
 SASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT
 GCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCY
 FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD
 GSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVLSVLEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.40: Аминокислотная последовательность hIFN α -HA-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
 SGGGSRDTTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLSHNGKLCRLKGIAPLQ
 LGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFE
 RFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNNKKGKE
 VLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPKVRDQAGRMNYY
 WTLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLP
 YQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
 SGGGSRMTMHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
 HYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSVLSVLEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.42: Аминокислотная последовательность первой цепи hIFN-Fc-hole в гетеродимере
 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFKL VSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

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

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
 GLGFTPPHGGLLGSWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA
 KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
 PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQ
 REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGK
 CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
 FPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLV
 LWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWT
 LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
 NIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

MHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPRAHYNI
 VTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRLTLEDLLMGTGLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO.47: Аминокислотная последовательность hIFN α -Pan-Pres1-Fc в гомодимере
 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKV
 GAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQ
 AFEDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL
 YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPD
 DFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYLRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFED
 KTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
 LDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDSHNGKLCRLKGIAP
 LQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSS
 FERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKG
 KEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMN
 YYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSS
 LPYQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPD
 RAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.51: Аминокислотная последовательность первой цепи hIFN α -Fc-hole в гетеродимере
 CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQIQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
 NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPHGGLLGWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGR
 QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
 NRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVROIAPG
 QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNVNYLYRFRKSNLKPFERDISTEI
 YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
 NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 LSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED
 SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDF
 IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
 YPKLNYSYVNNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQNENAYVSVVTSNYNRRFTPEIA
 ERPKVRDQAGRMNYWTLTKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
 CNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGCEPKYVRSAKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTH
 CTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
 EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLRCLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGLGIVCPICS
 QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO.56: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pres1-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRMTMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGA
GAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTL PANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAF
EDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYN
SASFSTFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFT
GCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCY
FPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.58: Аминокислотная последовательность hmIFN α -HA-Fc в гомодимере

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDSSHNGKLCRLKGIAPLQ
LGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFE
RFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKE
VLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPKVRDQAGRMNYY
WTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCTPLGAINSSLP
YQNIHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMKED
SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGG
SGGGGSRTMHGDPTLHEYMLDLQPETDL CYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRA
HYNIVTFCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTLGIVCPICSKPFEDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.60: Аминокислотная последовательность первой цепи hmIFN-Fc-hole в гетеродимере
 CDLPQTHSLGSRRTMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKIFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSKESGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

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

MGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVGAGAF
 GLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQAFEDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFEDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQ
 REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLEDSSHNGKLCRLKGIAPLQLGK
 CNIAGWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEI
 FPKESSWPNNHTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKESYPKLNKSYVNKKGKEVLV
 LWGIHPPNSKEQQNLYQENENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPVRDQAGRMNYYWT
 LLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQ
 NIHPVTIGECPKYVRSACLKRMVTLGRNPNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
 QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

MHGDPTLHEYMLDLQPETDLICYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNI
 VTFCKCDSLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO.65: Аминокислотная последовательность hmIFN α -Pan-Pres1-Fc в гомодимере
 CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKV
 GAGAFGLGFTPPHGGLLWSPQAQGILQTLPANPPPASTNRQTGRQPTPLSPPLRNTHPQ
 AFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL
 YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPD
 DFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYLRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGF
 NCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFFED
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDSSHNGKLCRLKGIAP
 LQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSS
 FERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNNKKG
 KEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPQVRDQAGRMN
 YYWTLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSS
 LPYQNIHPVTIGECPKYVRSKLRMVTGLRNNPSIQSRFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCVSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNLEACVIQGVGVGTETPLMKED
 SILAVRKYFRRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEAKFVAAWTL
 KAAAGSGSGSMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPD
 RAHYNIVTFCKCDSTLRVCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICSQKPFEDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCVSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.69: Аминокислотная последовательность первой цепи hmIFN α 4-Fc-hole в гетеродимере
 CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLDDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKED
 SILAVRKYFRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKESGGGGSGGG
 GSGGGSGGGGRTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSH
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMGQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDF
 NPNKDTWPDANKVGAGAFGLGFTPPHGGLLGWSPQAQILQTLPANPPPASTNRQTGR
 QPTPLSPPLRNTHPQAFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV
 VDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
 NRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPG
 QTGKIADYNYKL PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
 YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKST
 NLVKNKCVNFFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 LSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSDTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLD
 SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSGENGICYPGDF
 IDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGS
 YPKLKNYSYVNNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYYNRRFTPEIA
 ERPKVRDQAGRMNYWTLTKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHE
 CNTKCKQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECPKYVRSALRMVMTGLRNNPSIQSRFEDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

AKFVAAWTLKAAAGSGSGSMHGDPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE
 EDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICS
 QKPFEDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

8. Последовательности антител, используемых для замены Fc SEQ ID NO.20: Аминокислотная последовательность ScFv (PD-L1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLHPATFGGQTKVEIKRGGGGSGG
GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVA
WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY
WGQGLVTVSA

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPY
GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSA

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLHPATFGGQTKVEIKR

9. Последовательности других вирусных антигенов

SEQ ID NO.76: Аминокислотная последовательность спайкового белка SARS-CoV-2

VNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDLSTQSLIVNNAITNVVIK
CEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN
LREFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPGQFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT
PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTE
KGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLY
NSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDF
TGCVIAWNSNLDLSDKVGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC
YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGL
TGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCFSGGVSIVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI
GAGICASYQTQTNPRRARSVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILP
VSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVK
QIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARD
LICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMA YRFN
GIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQD
VVNQAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQ
QLIRAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSPQSAPHGVVFLHVTYV
PAQEKNTTAPAICHDKGAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCD
VVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNIQKEIDRLNE
VAKNLNESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCCLKGC
CSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

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

VNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV
SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDLSTQSLIVNNAITNVVIK
CEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN
LREFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPGQFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT
PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTE
KGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLY
NSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDF
TGCVIAWNSNLDLSDKVGNYNYLYRFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC
YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGL
TGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCFSGGVSIVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPI
GAGICASYQTQTNPRRAR

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNCFYFP
 LQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGC
 IAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVKGFNCFYFP
 QSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVQGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

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

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSAS
 FSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC
 VIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSKPCNGVEGFNCYFP
 LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF

10. Последовательности других опухолевых антигенов:

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

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

SRACPPCAPACKDNHCWGESPEDCQILGTICTSGCARCKGRLPTDCCHEQCAA
 GCTGPKHSDCLACLFNHSICELHCPALVTYNTDTFESMHNPEGRYTFGASCVTTCPY
 NYLSTEVGSCTLVCPNNEVTAEDGTQRCEKCSKPC

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

GCKKIFGSLAFLPESFDGDPSSGIAPLRPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLRLD
 SVFQNLRIIRGRILHDGAYSLTLQGLGIHSLGLRSLRELGSGLALHRNAHLCFVHTVPWD
 QLF

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

VCNSLCAHGHWCWPGPTQCVNCSHFLRGQECVEECRVWKGLPREYVSDKRCLP
 CHPECQPQNSSETCFGSEADQCAACAHAHYKDSSSCVARCPGKVPDLSYMPIWKYPDEEG
 ICQPCPINCTHSCVDLDERGCP

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

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

SRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCA
 AGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEADGTQRCEKCSKPC

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

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

CHQLCARGHCWPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPC
 HPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHAHYKDPFVCVARCPGKVPDLSYMPIWKFPDEEG
 ACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPC

11. Последовательности антигенов вируса герпеса, используемые в примерах: SEQ ID NO. 91 VZV оболочечный гликопротеин E (aa 31-538)

SVLRYDDFHTDEDKLDNTNSVYEPYHSDHAESSWVNRGESSRKAYDHNSPYIW
 PRNDYDGFLENAHEHHGVYNQGRGIDSGERLMQPTQMSAQEDLGDDTGIHVIPTLNGD
 DRHKIVNVDQRQYGDVFKGDLNPKPQGQRLIEVSVEENHPFTLRAPIQRIYGVRYTETW
 SFLPSLTCTGDAAPAIQHICLKHTTCTCFQDVVDVDCAENTKEDQLAEISYRFQGGKEAD
 QPWIVVNTSTLFDLELDPPEIEPGVLKVLRTKQYLGVIWVNMGRGSDGTSTYATFLVT
 WKGDTRNPTPAVTPQPRGAEFHMWNHSHVFSVGDTFSLAMHLQYKIHEAPFDLL
 EWLYVPIDPTCQPMRLYSTCLYHPNAPQCLSHMNSGCTFTSPHLAQRVASTVYQNCEH
 ADNYTAYCLGISHMEPSFGLILHDGGTTLKFVDTPESLSGLYVVFVYFNGHVEAVAYTV
 VSTVDHFVNAIEERGFPPTAGQPPATTKPEITPVNPGTSPLLR

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

MEAALLVCQYTIQSLIHLTGEDPGFFNVEIPEFPFYPTCNVCTADVNTINFVGG
 KKHQLDLDFGQLTPHTKAVYQPRGAFGGSENAATNLFLELLGAGELALTMRSKKLPIN
 TTGEEQQSLESVDVYFQDVFGTMWCHHAEMQNPVYLIPETVPYIKWDNCNSTNITAV
 VRAQGLDVTPLSLPTSAQDSNFSVKTMQLGNEIDIECIMEDGEISQVLPDGNKFNITCSG
 YESHVPSSGILTSTSPVVTPIPGTYAYSLRLTPRPVSRFLGNNILYVFYSGNGPKASGG
 DYCIQSNIVFSDEIPASQDMPTNTTDTITYVGDNATYSVPMVTSEDANSPNVTVAFWAW
 PNNTETDFKCKWLTSGTSPGCENISGAFASNRTFDITVSGLGTAPKTLITRATNATTT
 THKVIFSKAP

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

KYALADPSLKMADPNRFRGKNLPLVDRLTDPGPKRVYHIQPSLEDPFQPPSIPIT
 VYYAVLERACRSVLLHAPSEAPQIVRGASDEARKHTYNLTIAWYRMGDNCAIPITVME
 YTECPYNKSLGVCPIRTQPRWSYYSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDW
 TEITQFILEHRARASCKYALPLRIPPAACLTSAKAYQGGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVALY
 SLKIAGWHGPKPPYTSTLLPPELSDTTNATQPELVPEDPEDSALLEDPAGTVSSQIPPNWH
 IPSIQDVAPHHAPAAPSNP

Краткое описание чертежей

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

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

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

Фиг. 4 представляет схематическую диаграмму вакцинной платформы в форме гомодимера с рас-

положением в следующем порядке: интерферон-связывающий фрагмент 1-Т-хелперный эпитоп-связывающий фрагмент 2-целевой антиген-Fc иммуноглобулина (или антитело).

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

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

Фиг. 7 представляет картину SDS-PAGE электрофореза неденатурированных белков Pres1-Fc и IFN-βpres1-Fc.

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

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

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

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

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

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

Фиг. 13 показывает, что комбинация IFNα-Pres1-Fc и HBsAg коммерческой вакцины нарушала иммунную толерантность против HBsAg и индуцировала серологическую конверсию HBsAg-HBsAb. Мышей-носителей HBV иммунизировали подкожно IFNα-Pres1-Fc и HBsAg коммерческой вакциной один раз каждые две недели, всего три раза. (а) Уровень Pres1 в сыворотке мышей-носителей HBV. (б) Уровень HBsAg. (с) Уровень анти-Pres1 в сыворотке. (д) Уровень анти-HBsAg в сыворотке. (е) Уровень HBV-ДНК в сыворотке. ***p<0,001.

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

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

Фиг. 16 показывает определение антисывороточных RBD-специфических антител, продуцируемых в результате IFNα-Pan-RBD (исходный штамм)-Fc и IFNα-Pan-RBD (южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc иммунизации. (а) Картина SDS-PAGE электрофореза IFNα-Pan-RBD (исходный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (б) Картина SDS-PAGE электрофореза IFNα-Pan-RBD (южноафриканский му-

тантный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (c) Связывание RBD-специфического антитела с RBD исходного штамма через 14 дней после инокуляции IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD (южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc. (d) Связывание RBD-специфического антитела с RBD южноафриканского мутантного штамма через 14 дней после инокуляции IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc.

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

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

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

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

Фиг. 21 показывает, что интраназальная инокуляция SARS-CoV-2 вакцины IFN-Pan-RBD-Fc без адъюванта индуцировала высокие титры RBD-специфических IgG и IgA нейтрализующих антител в тканях носоглотки и легких. C57BL/6 мышей возраста 6-8 недель умерщвляли в день 28 после иммунизации и слизистую оболочку носа мышей извлекали и измельчали с использованием тканевого гомогенизатора. Гомогенизированную жидкость центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и супернатант получали как супернатант слизистой оболочки носовой полости (NMDS). Метод ELISA использовали для определения уровней SARS-CoV-2 RBD-специфических антител IgG(a) и IgA(b) в супернатанте ткани слизистой оболочки носа (NMDS) каждой группы; на 28 день сыворотку собирали для эксперимента по нейтрализации SARS-CoV-2 псевдовируса *in vitro* (c). Статистический метод: однофакторный дисперсионный анализ, * $p < 0,05$ представляет значимую разницу, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

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

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

Фиг. 24 показывает анализ противоопухолевой активности Her2 вакцин IFN α -3-Fc и IFN α -pan-3-Fc. Была создана мышинная модель рака молочной железы TUBO, и мышей обрабатывали внутриопухолевой инъекцией родственных слитых белков раз в неделю всего 3 раза, когда размер опухоли достигал 50-80 мм³. Дозировка IFN α -3-Fc составляла 10 мкг/доза/мышь, другие слитые белки вводили в эквимо-

лярных количествах и CpG использовали в качестве адьюванта. Размер опухоли измеряли и строили кривую роста опухоли.

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

Фиг. 26 показывает картину SDS-PAGE электрофореза IFN -HA1-Fc слитого белка.

Фиг. 27 показывает, что мышей внутримышечно инокулировали 10 мкг $IFN\alpha$ -HA1-Fc или таким же молярным количеством HA1 белка, а бустер-иммунизацию осуществляли через 14 дней после первой инокуляции. Сыворотку мышей собирали на 28-й день после иммунизации и определяли уровень HA1-специфических антител в мышинной сыворотке методом ELISA. Мышей инфицировали путем назального введения 1000 БОЕ вируса гриппа A/PR8 в день 42 после иммунизации. С третьего дня после инфицирования вирусом мышей наблюдали и регистрировали изменения массы тела/ (а) Сыворотку мышей собирали через 28 дней после первой иммунизации и уровень HA1-специфических антител в мышинной сыворотке определяли методом ELISA. (б) Изменения массы тела мышей после инфицирования вирусом.

Фиг. 28. Картины SDS-PAGE электрофореза белков $IFN\alpha$ -Pan-VZV-gE-Fc, $IFN\alpha$ -Pan-EBV-gp350-Fc и $IFN\alpha$ -Pan-HSV-2-gD-Fc.

Подробное описание изобретения

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

Пример 1. Конструкция вакцинной платформы.

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 2. Конструирование, очистка и получение вакцинной платформы.

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

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

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

Конструкция вектора (на примере антигена preS1 HBV)

- (1) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-BsiwI-PreS1-BstBI-hIgG1-EcoRI.
- (2) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-BsiwI-RBD(SARS-CoV-2)-BstBI-hIgG1-EcoRI.
- (3) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-Bsiwi-PADER-PreS1-hIgG1-EcoRI.
- (4) PEE12.4-HindIII-сигнальный пептид 1-интерферон-Bsiwi-PADER-RBD(SARS-CoV-2)-hIgG1-EcoRI.

EcoRI.

Линкеры между каждыми из фрагментов слитого белка были следующими:

- (1) Линкер между интерфероном и PreS1 представлял собой связывающий фрагмент 1.
- (2) Линкер между интерфероном и RBD (SARS-CoV-2) представлял собой связывающий фрагмент 1.
- (3) Линкер между интерфероном и PADER представлял собой связывающий фрагмент 1, а линкер между PADER и PreS1 представлял собой связывающий фрагмент 2.
- (4) Линкер между интерфероном и PADER представлял собой связывающий фрагмент 1, а линкер между PADER и RBD (SARS-CoV-2) представлял собой связывающий фрагмент 2.

1.2. Быстрая экспрессия представляющего интерес белка путем транзientной трансфекции.

(1) Размораживание клеток: Freestyle 293F клетки замораживали в среде CD OptiCHO™ (содержащей 10% DMSO) при концентрации 3×10^7 клеток/мл. Клетки извлекали из жидкого азота, а затем быстро растворяли в 37°C водяной бане, добавляли в 15-мл центрифужную пробирку, содержащую 10 мл OptiCHO™ среды, и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант сливали и клеточный осадок суспендировали и культивировали в 30 мл среды OptiCHO™ при 37°C, 8% CO₂, 135 об/мин. Через 4 дня клетки подвергали продленному культивированию, и концентрация не должна была превышать 3×10^6 клеток/мл в процессе продленного культивирования.

(2) За два дня до трансфекции суспензию культивированных 293F клеток подготавливали для транзientной трансфекции (200 мл) с плотностью посева $0,6-0,8 \times 10^6$ клеток/мл.

(3) Через два дня клетки в суспензии для трансфекции подсчитывали, и плотность клеток составила $2,5-3,5 \times 10^6$ клеток/мл, затем клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и супернатант сливали.

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

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

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

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

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

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

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

1.3. Сбор, очистка и подтверждение слитого белка методом электрофореза 2. Очистка представляющего интерес белка с использованием Белка А.

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

(2) Сборка хроматографической колонки: соответствующее количество агарозы с белком А (количество было рассчитано путем очистки 20 мг слитого белка Fc человека на 1 мл белка А) тщательно смешивали, добавляли в хроматографическую колонку, оставляли при комнатной температуре около 10 мин; после разделения белка А и 20% раствор этанола выпускное отверстие на дне открывали, чтобы позволить этанольному раствору медленно вытекать под действием силы тяжести.

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

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

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

(6) Колонку элюировали элюирующим буфером (0,1 М глицина, pH 2,7); элюент собирали в от-

дельные пробирки, 1 пробирка на 1 мл элюента; и пики элюции наблюдали с раствором индикатора белка (анализ белка Bio-Rad). Пробирки для сбора элюированных пиков перемешивали и добавляли соответствующее количество 1 M Tris, pH 9,0 (для доведения pH до 6-8, что должно отличаться более чем на 0,5 от изоэлектрической точки очищенного белка).

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

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

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

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

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

Методы.

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

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

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

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

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

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

Методы.

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

(2) Детекция Pres1-специфического антигена в сыворотке методом ELISA. Покрытие антигеном:

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

Результаты: мыши в группе, иммунизированной IFN α -Pres1-Fc, могли продуцировать высокий уровень антител к Pres1 до инокуляции вирусом, и антитела оставались на высоком уровне во время вирусной инфекции, как показано на фиг. 9 (а). По сравнению с группой без иммунизации белком, иммунизация IFN- β res1-Fc вакциной могла существенно предотвращать HBV инфекцию, и анти-preS1 антитело, продуцируемое после иммунизации, могло быстро и полностью устранять preS1 антиген в сыворотке (фиг. 9(b)), и большинство вирус-инфицированных мышей в группе, иммунизированной IFN- β res1-Fc, были отрицательными на HBsAg в периферической крови (фиг. 9(c, d)). Описанные выше экспериментальные результаты показывают, что IFN- β res1-Fc в качестве вакцины мог эффективно предотвращать HBV инфекцию, как показано на фиг. 9.

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

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

Методы.

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

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

Результаты: был определен preS1 антиген в сыворотке мышей-носителей, иммунизированных IFN- β res1-Fc вакциной, а также изменения антител к Pres1 и HBsAg в сыворотке. Результаты показывают, что после иммунизации IFN α -Pres1-Fc вакциной у мышей рабатывались высокие уровни анти-Pres1 антител, как показано на фиг. 10(a), и preS1 антиген в сыворотке мог быть полностью устранен, как показано на фиг. 10(b). В то же время, HBsAg в сыворотке также снижался в определенной степени, как показано на фиг. 10(c), при этом необработанная контрольная группа и группа, иммунизированная только Pres1 вакциной, не имели никакого терапевтического эффекта, как показано на фиг. 10.

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

Материалы: такие же, как в примере 3.

Методы.

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

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

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

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

Материалы: C57BL/6 самцов мышей (возраст 4 недели) закупили у Beijing Vital River Laboratory An-

imal Technology Co., Ltd. AAV-HBV 1.3 закупали у Guangzhou PackGene Biotech Co., Ltd. Набор для детекции HBsAg закупали у Shanghai Kehua Bio-Engineering Co., Ltd., а другие экспериментальные материалы были такими же, как в примере 4.

Методы.

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

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

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

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

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

Методы.

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

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

Результаты: было обнаружено, что комбинация IFN α -Pan-Pres1-Fc с коммерческим HBsAg в качестве стратегии лечения хронического гепатита В может в конечном итоге нарушить толерантность к HBsAg. Иммунный ответ, генерируемый у HBV-толерантных мышей, мог полностью уничтожить антиген preS1 в сыворотке, как показано на фиг. 13(a), и в сыворотке наблюдалась высокая концентрация антител к Pres1 (фиг. 13(c)). Интересно, что вакцина IFN-Pan-Pres1-Fc одновременно эффективно уничтожала HBsAg в сыворотке и индуцировала частичную серологическую конверсию HBsAb (фиг. 13(b) и 4(d)), что клинически рассматривалось как ключевой показатель излечения от HBV. Кроме того, были определены уровни экспрессии HBV-связанной ДНК, в периферической крови методом количественной флуоресцентной ПЦР в реальном времени. Результаты показали, что по сравнению с контрольной группой иммунизация комбинацией IFN α -Pan-Pres1-Fc и коммерческого HBsAg может в результате снизить уровень ДНК HBV в периферической крови (фиг. 13(e)). Основываясь на приведенных выше результатах, авторы изобретения предложили вакцинную стратегию для лечения хронического гепатита В с использованием комбинации IFN α -Pan-Pres1-Fc и коммерческой вакцины на основе HBsAg.

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

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

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

Методы.

(1) Мышей иммунизировали IFN α -RBD(SARS-Cov-2)-Fc слитым белком; в частности, мышей под-

можно иммунизировали 10мкг IFN α -RBD-Fc, RBD-Fc или 10мкг RBD белка, смешанного с алюминиевым адьювантом. Через 28 дней после иммунизации сыворотку мышей собирали путем отбора крови из глазницы для детекции SARS-Cov-2-специфических антител.

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

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

(3) Эксперимент по нейтрализации псевдовирусного S белка SARS-CoV-2 S *in vitro*. Антисыворотку разбавляли 1:3 и добавляли в 96-луночный планшет и 50 мкл псевдовирусных частиц с люциферазой-спайковым белком добавляли в лунки, смесь вируса и антитела оставляли при 37°C в течение 1 ч и 10⁴ 293-hACE2 клеток на лунку добавляли в 96-луночный планшет. 96-луночный планшет оставляли в 37°C инкубаторе клеточной культуры и активность люциферазы определяли через 48 ч.

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

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

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

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

Методы.

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

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

(3) Анализ ответа антител методом ELISA был таким же, как описано в примере 9. Результаты: результаты SDS-PAGE показали нужный размер полосы IFN α -Pan-RBD(SARS-CoV-2 исходный штамм)-Fc, указывая на то, что мутантный SARS-CoV-2 IFN α -RBD (исходный штамм SARS-CoV-2)-Fc вакцинный белок был успешно сконструирован, экспрессирован и очищен (фиг. 16a). SDS-PAGE результаты показали нужный размер полосы IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, указывая на успешную конструкцию, экспрессию и очистку мутантного вакцинного белка SARS-CoV-2 IFN α -RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc (фиг. 16b). Результаты ELISA показали, что антитела, индуцированные иммунизацией мышей IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, могли связываться с RBD белком исходного штамма SARS-CoV-2, и не было никакой значимой разницы в способности к связыванию с RBD исходного штамма (фиг. 16c). При этом, результаты ELISA для RBD южноафриканского мутантного штамма также показали, что антитела, индуцированные иммунизацией мышей с использованием IFN α -Pan-RBD(исходный штамм)-Fc и IFN α -Pan-RBD(южноафриканский мутантный штамм SARS-CoV-2)-Fc, могли связываться с RBD южноафриканского мутантного штамма, и их связывающие способности

были эквивалентными (фиг. 16d).

Пример 11.

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

Методы.

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

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

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

Результат:

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

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

Пример 12.

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

Методы.

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

(2) Определение антитела к RBD SARS-cov2 в сыворотке. Покрытие антигеном: покрывающий раствор RBD (1,5 мкг/мл) добавляли в планшет для ELISA (Coating 9018) при 100 мкл на лунку и планшет покрывали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали один раз PBS, 260 мкл на лунку. Планшет бло-

кировали с использованием 100мкл 5% блокирующего раствора (5% FBS) в течение двух часов при 37°C. Образцы сыворотки разбавляли PBS (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000...), добавляли в блокированный ELISA планшет при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли фермент-меченное вторичное антитело (фермент-конъюгированный антимишинный IgG-HRP в разведении 1:5000 в PBS) при 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшет промывали 5 раз PBST (каждый раз по 260 мкл), добавляли субстрат TMB при 100мкл/лунка, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, ожидая проявления цвета субстратом. В каждую лунку добавляли 50 мкл стоп-раствора (2N H₂SO₄), чтобы остановить проявление цвета и планшет считывали на микропланшет-ридере при OD450-630. Расчет титра: выбирали максимальный коэффициент разведения, который был положительным, и коэффициент разведения умножали (X) на значение OD/пороговое значение (0,1), соответствующее коэффициенту разведения, и полученное значение представляло собой титр антитела, соответствующий сыворотке.

Результат.

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

Пример 13.

Материалы.

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

Методы.

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

Результат.

Как показано на фиг. 20, две назальные иммунизации белками RBD и RBD-Fc могли в некоторой степени вызывать ответ антител. Уровни сывороточных IgG и IgA в этой же временной точке, индуцированные двумя назальными иммунизациями IFN α -pan-RBD-Fc, были существенно выше по сравнению с уровнями в группах введения RBD, RBD-Fc и IFN-RBD-Fc. Результаты экспериментов по нейтрализации псевдовируса показали, что по сравнению с группами, иммунизированными RBD и RBD-Fc, IFN-RBD-Fc может индуцировать более высокий уровень нейтрализующих антител.

Пример 14.

Материалы.

Материалы были такими же, как в примере 10.

Методы.

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

Получение супернатанта ткани слизистой оболочки носа и жидкости лаважа легких мышей, используемых в экспериментах по иммунизации: После того, как мышей умерщвляли в состоянии покоя, слизистую оболочку носа мышей собирали и измельчали с использованием тканевого гомогенизатора. Гомогенизированную жидкость центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и супернатант использовали как супернатант ткани слизистой оболочки носовой полости (NMDS). Для легких мышей с ис-

пользованием шприца объемом 1 мл набирали около 0,8 мл HBSS+100 мкМ EDTA, вводили в эндотрахеальную трубку, осторожно продували и вводили путем ингаляции, повторяя это три раза, затем жидкость отсасывали, собирали в центрифужную пробирку; процедуру повторяли три раза и, наконец, получали около 2 мл жидкости лаважа легких. Жидкость лаважа легких мышей центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, и полученный супернатант представлял собой жидкость бронхоальвеолярного лаважа мышей (BALF), а осадок представлял собой лимфоциты в легких мыши, которые можно было далее анализировать.

Результат.

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

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

Пример 15.

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

Материалы и методы.

Материалы.

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

Методы.

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

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

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

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

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

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

Результат.

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

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

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

Пример 16.

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

Методы.

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

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

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

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

Результат.

Как показано на фиг. 26, после экспрессии и очистки белка результат определения размера и чистоты белка методом SDS-PAGE показал единственную полосу в положении представляющего интерес размера полосы. Как показано на фиг. 27, IFN α -HA1-Fc может индуцировать более высокий титр HA1-специфических антител, чем белок HA1 (фиг. 27а), указывая на то, что вакцинальная платформа может повышать иммуногенность белка HA1. После того, как мышей подвергли контрольному заражению, наблюдалось значительное изменение их массы тела. Однако по сравнению с группой, получавшей PBS, и

группой, иммунизированной белком HA1, масса тела мышей в группе, иммунизированной IFN α -HA1-Fc, быстро восстанавливалась, показывая, что иммунизация вакциной IFN α -HA1-Fc продемонстрировала хорошую защиту от инфекции гриппа (фиг. 27b).

Пример 17.

Материалы и методы.

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

Результат.

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

Литература.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

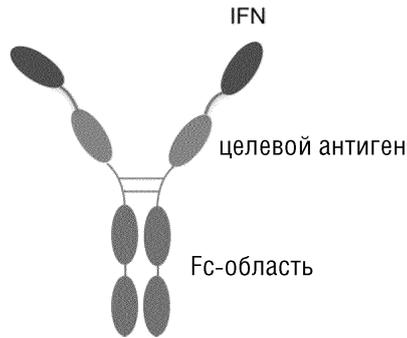
1. Вакцина, которая включает слитый белок, содержащий в качестве структурной единицы интерферон-целевой антиген-Fc-область иммуноглобулина, где интерферон является первой структурной единицей, которая представляет собой интерферон I типа, интерферон II типа или интерферон III типа, Fc-область иммуноглобулина является второй структурной единицей и целевой антиген является третьей структурной единицей.
2. Вакцина по п.1, которая имеет любой из следующих признаков:
 - 1) первая структурная единица выбрана из IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28a), IFN- λ (IL-28b) и IFN- ω ;
 - 2) первая структурная единица происходит от человека или мыши;
 - 3) первая структурная единица выбрана из IFN- α 4 мыши, IFN- α 2 человека, мутантов IFN- α 2 человека, связывающихся с рецепторами IFN человека и мыши;
 - 4) первая структурная единица выбрана из SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22;

- 5) вторая структурная единица выбрана из Fc-области IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgM;
- 6) вторая структурная единица выбрана из области Fc, как показано в SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.23 и SEQ ID NO.24;
- 7) третья структурная единица представляет собой опухолевый антиген или антиген патогена;
- 8) третья структурная единица представляет собой вирусный или бактериальный антиген;
- 9) вакцина является таргетной вакциной и
- 10) слитый белок содержит один или более хелперных эпитопов Th-клеток и/или связывающих фрагментов.
3. Вакцина по п.1 или 2, которая имеет любой из следующих признаков:
- 1) третья структурная единица представляет собой вирусный антиген, и вирус представляет собой HBV, HPV, VZV, EBV, HSV-2, HIV, вирус гриппа или коронавируса;
- 2) третья структурная единица представляет собой вирусный антиген, и вирус представляет собой SARS-COV, SARS-COV-2 или MERS-CoV,
- 3) третья структурная единица представляет собой антиген Pres1 HBV, антиген HBsAg или пептидные фрагменты,
- 4) третья структурная единица представляет собой антиген Pres1 HBV подтипа ad или подтипа ay,
- 5) третья структурная единица представляет собой антиген Pres1 HBV подтипа ad, показанный в SEQ ID NO.6, антиген Pres1 HBV подтипа ay, показанный в SEQ ID NO.26; антиген HBsAg HBV подтипа adr, показанный в SEQ ID NO.7, антиген HBsAg HBV подтипа adw, показанный в SEQ ID NO.27, антиген HBsAg HBV подтипа ayw, показанный в SEQ ID NO.28,
- 6) третья структурная единица представляет собой антиген RBD SARS-COV2,
- 7) третья структурная единица представляет собой антиген RBD SARS-COV2, показанный в SEQ ID NO.8,
- 8) третья структурная единица представляет собой антиген вируса гриппа,
- 9) третья структурная единица представляет собой антиген HA вируса гриппа,
- 10) третья структурная единица представляет собой такой антиген, как HA вируса гриппа, показанный в SEQ ID NO.9,
- 11) третья структурная единица представляет собой антиген E7 HPV, показанный в SEQ ID NO.10,
- 12) третья структурная единица представляет собой антиген gE,
- 13) третья структурная единица представляет собой антиген gE вируса опоясывающего герпеса (VZV), показанный в SEQ ID NO.91,
- 14) третья структурная единица представляет собой EBV-gp350,
- 15) третья структурная единица представляет собой белок gp350 вируса Эпштейна-Барр (EBV), показанный в SEQ ID NO.92,
- 16) третья структурная единица представляет собой антиген gD,
- 17) третья структурная единица представляет собой антиген gD вируса простого герпеса 2 (HSV-2), показанный в SEQ ID NO.93,
- 18) третья структурная единица представляет собой EBV EBNA1/LMP2, VZV-IE62, HSV-2 ICP0, антиген gp120 ВИЧ,
- 19) третья структурная единица представляет собой мутантный вирусный антиген,
- 20) третья структурная единица представляет собой мутант SARS-COV-2,
- 21) третья структурная единица представляет собой естественные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения, искусственные точечные мутации/делеционные мутации/мутации с добавлением/усечения, любую комбинацию естественных или искусственных мутаций, подтипы, образующиеся в результате мутаций, происходящие из белка SARS-COV-2,
- 22) третья структурная единица представляет собой мутант одного или более из S белка, N белка, М белка, Е белка,
- 23) третья структурная единица представляет собой мутант полноразмерного S белка с SEQ ID NO.76, S1 области с SEQ ID NO.77, RBD области с SEQ ID NO.78 SARS-COV-2 дикого типа,
- 24) третья структурная единица включает одну или более из следующих мутаций S белка SARS-COV-2: делецию 69-70 NTD области, делецию Y144, делецию 242-244, мутации L18F, D80A, D215, R246I, мутации K417, E484, N501Y, L452R RBD области, мутации D614G, H655Y,
- 25) третья структурная единица включает мутации, присутствующие в британском B.1.1.7 (501Y.1) мутантном штамме, южноафриканском B.1.351 (501Y.2) мутантном штамме и бразильском P1 (501Y.3) мутантном штамме, калифорнийском B.1.429 мутантном штамме,
- 26) третья структурная единица включает мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82,
- 27) третья структурная единица включает мутант, показанный в любой из SEQ ID NO.79, SEQ ID NO.80, SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82,
- 28) третья структурная единица слита с хелперным полипептидным эпитопом, который экспрессируется для усиления ответа В-клеток и Т-клеток и расположена на N-конце или C-конце антигенного эпитопа,

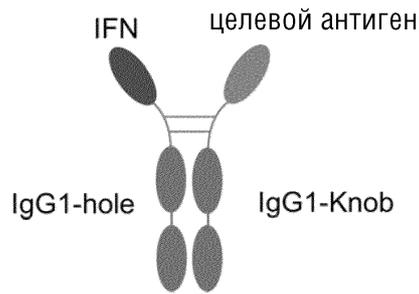
- 29) третья структурная единица слита с Pan HLA DR-связывающий эпитоп (PADER),
- 30) третья структурная единица слита с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO.3,
- 31) слитый белок содержит один или более связывающих фрагментов, и связывающие фрагменты каждой структурной единицы представляют собой гибкие полипептидные последовательности,
- 32) слитый белок содержит один или более связывающих фрагментов, как показано в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO.4 и SEQ ID NO.25,
- 33) N-конец каждой полипептидной последовательности, состоящей из структурных единиц, включает соответствующий сигнальный пептид, способный промотировать секрецию белка,
- 34) N-конец каждой полипептидной последовательности, состоящей из структурных единиц, включает соответствующий сигнальный пептид, как показано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO.5,
- 35) вакцина продуцируется эукариотическими системами экспрессии и
- 36) вакцина продуцируется эукариотической системой экспрессии 293F и клетками CHO.
4. Вакцина по п.1 или 2, которая имеет любой из следующих признаков:
- 1) третья структурная единица представляет собой опухолевый антиген, который содержит белковую молекулу, экспрессируемую на высоком уровне опухолевыми клетками,
- 2) третья структурная единица включает рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2/neu) и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR),
- 3) третья структурная единица включает белковую молекулу Her2, экспрессируемую на высоком уровне опухолевыми клетками, и ее функциональные области и усечения, и
- 4) третья структурная единица включает антиген, показанный в SEQ ID NO.85, 86, 97, 88, 89, 90.
5. Вакцина по любому из пп.1-4, где слитый белок представляет собой гомодимерный или гетеродимерный слитый белок, содержащий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь.
6. Вакцина по п.1, которая имеет любой из следующих признаков:
- 1) слитый белок включает один или более эпитопов хелперных Th-клеток и/или связывающих фрагментов в первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи гомодимера или гетеродимера,
- 2) первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь являются идентичными,
- 3) первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь, каждая, включают IFN, целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина или Ab последовательно от N-конца к C-концу, или эти три структурные единицы соединены в любом порядке с образованием гомодимера,
- 4) первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь, каждая, включают IFN, целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина или Ab последовательно от N-конца к C-концу,
- 5) первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь являются разными,
- 6) первая полипептидная цепь включает IFN и Fc-область иммуноглобулина или Ab последовательно от N-конца к C-концу, или включает Fc-область иммуноглобулина или Ab и IFN последовательно от N-конца к C-концу; вторая полипептидная цепь включает целевой антиген и Fc-область иммуноглобулина или Ab, причем целевой антиген расположен на N-конце, а Fc-область иммуноглобулина или Ab расположена на C-конце, или Fc-область иммуноглобулина или Ab может быть расположена на N-конце, а целевой антиген может быть расположен на C-конце; или три структурные единицы соединены в любом порядке с образованием гетеродимера, и
- 7) IFN и целевой антиген соответственно расположены на N-конце первой полипептидной цепи и или второй полипептидной цепи, а Fc-область иммуноглобулина или Ab расположена на C-конце первой полипептидной цепи и или второй полипептидной цепи.
7. Вакцина по п.5, которая имеет любой из следующих признаков:
- 1) первый полипептид и второй полипептид гомодимера включают аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO.11, 12, 13, 14, 29, 30, 31, 32, 38, 39, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 57, 59, 58, 65, 66, 67, 68,
- 2) первый полипептид гетеродимера включает аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO.15, 33, 42, 51, 60 и 69, а второй полипептид включает аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO.16, 17, 18, 19, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 55, 61, 62, 63, 64, 70, 71, 72, 73,
- 3) антитело включает нацеленные на DC антитела, антитела, блокирующие иммунные контрольные точки, иммуноактивирующие антитела, и
- 4) антитело включает анти-PD-L1 антитело с SEQ ID NO.20, анти-DEC205 антитело, анти-CD80/86 антитело.
8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок в вакцине по любому из пп.1-7.
9. Вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.
10. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.8 или вектор экспрессии по п.9.
11. Клетка-хозяин по п.10, представляющая собой эукариотическую клетку.

12. Применение слитого белка, охарактеризованного в любом из пп.1-7, в получении композиции для профилактики или лечения опухолей или патогенов, профилактики или лечения вирусов или бактерий, где вирусы представляют собой HBV, HPV, EBV, вирус гриппа, ВИЧ, коронавирусы, профилактики или лечения SARS-COV, SARS-COV-2, MERS-CoV.

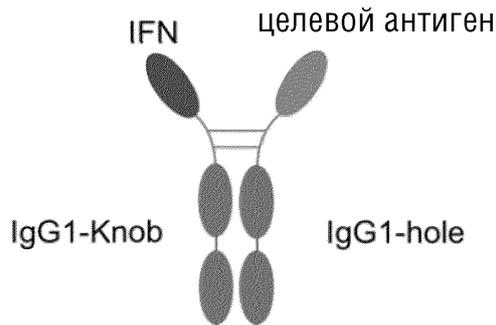
13. Применение слитого белка, охарактеризованного в любом из пп.1-7, в получении профилактической или терапевтической вакцины против гепатита В, HBV, гриппа, SARS-COV2, HPV, HPV-связанных опухолей, EBV, EBV-связанных опухолей или ВИЧ.



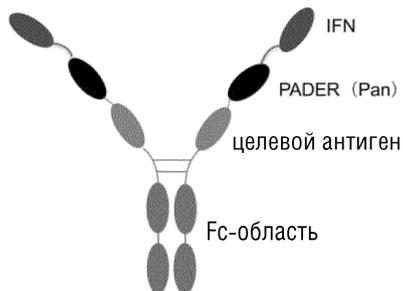
Фиг. 1



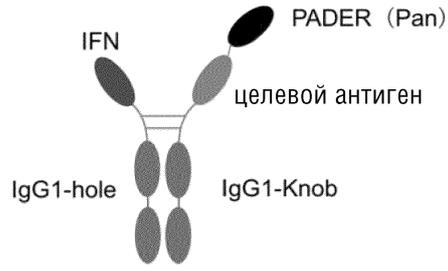
Фиг. 2



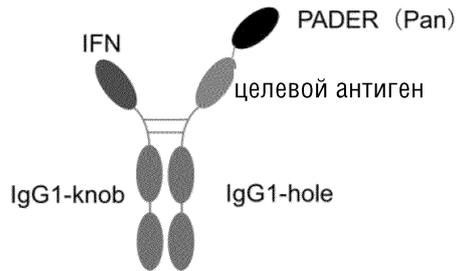
Фиг. 3



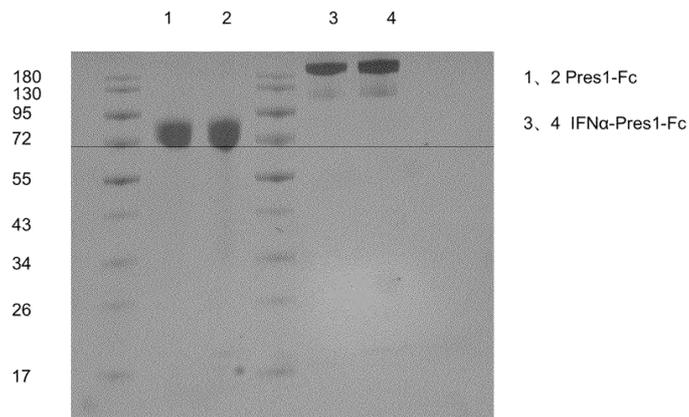
Фиг. 4



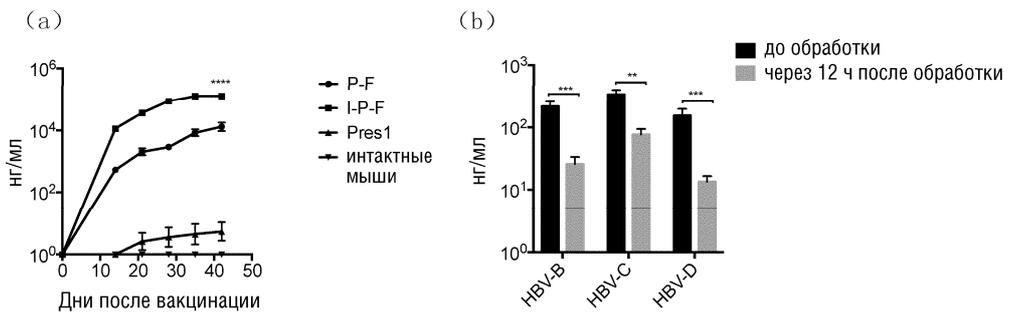
Фиг. 5



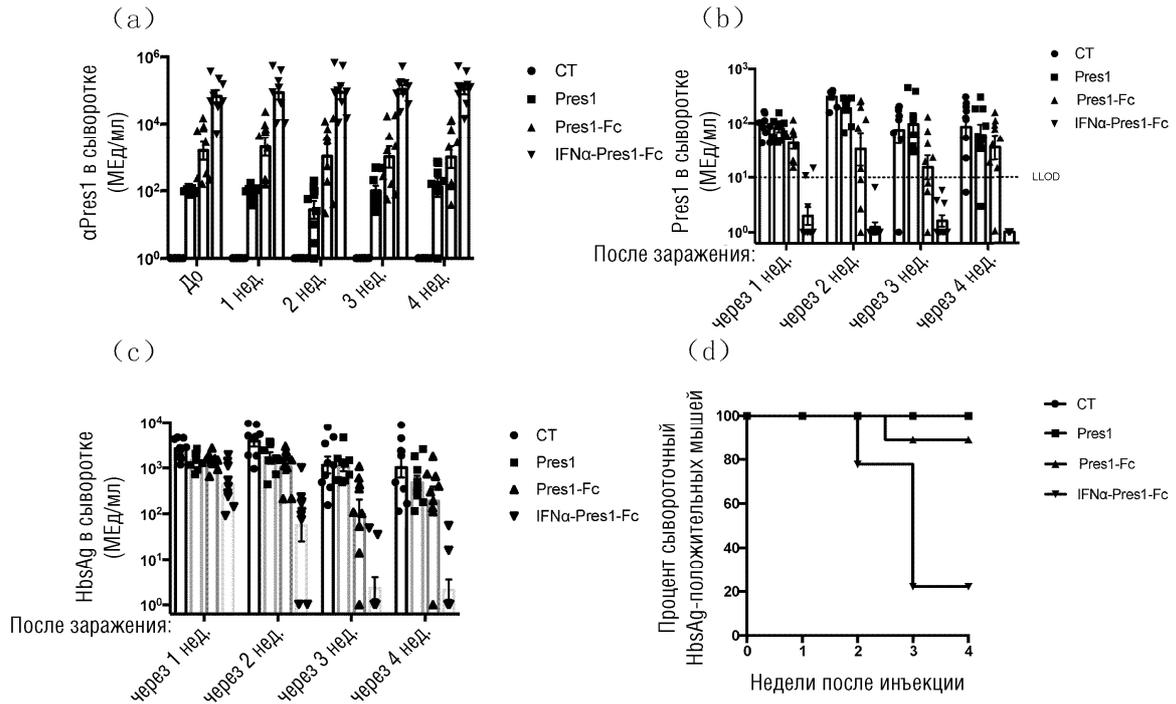
Фиг. 6



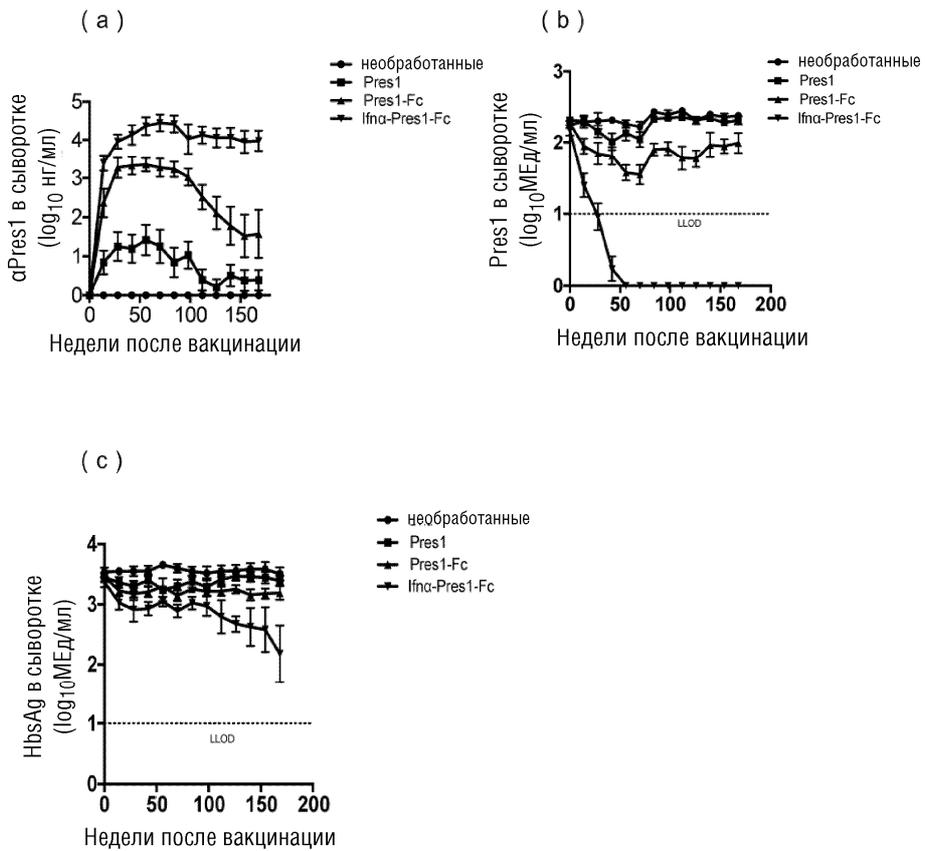
Фиг. 7



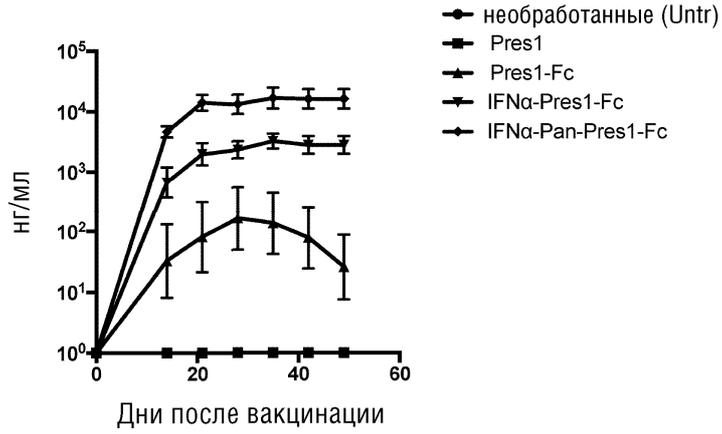
Фиг. 8



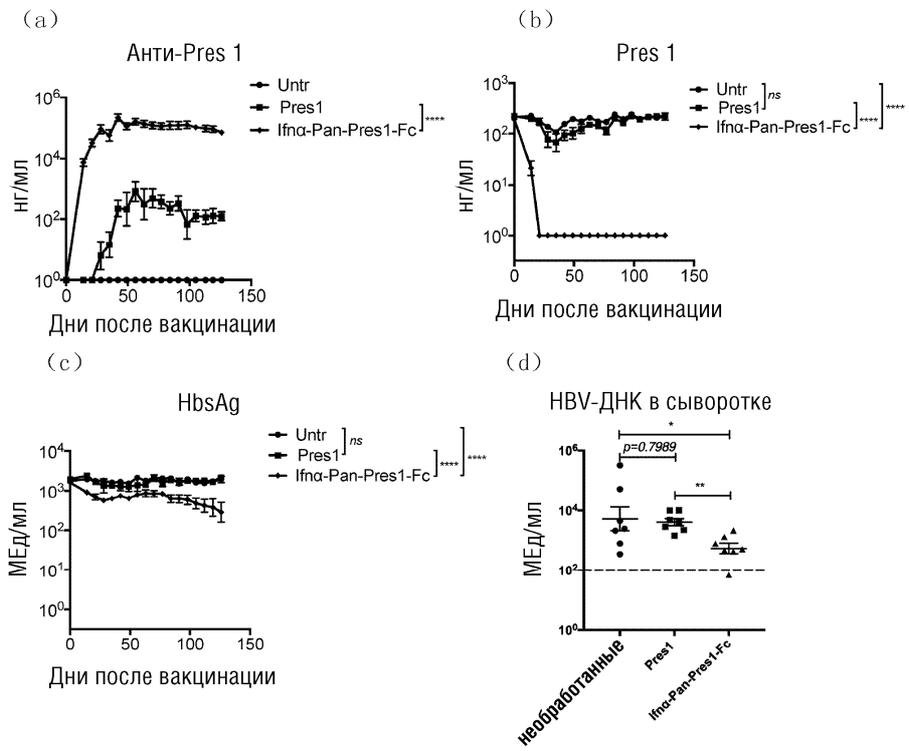
Фиг. 9



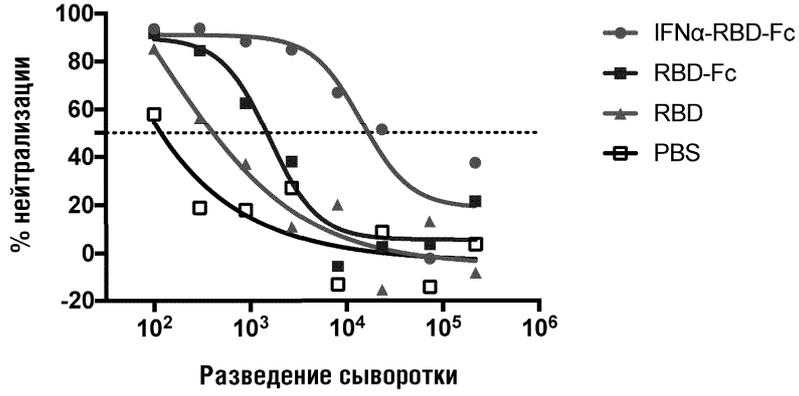
Фиг. 10



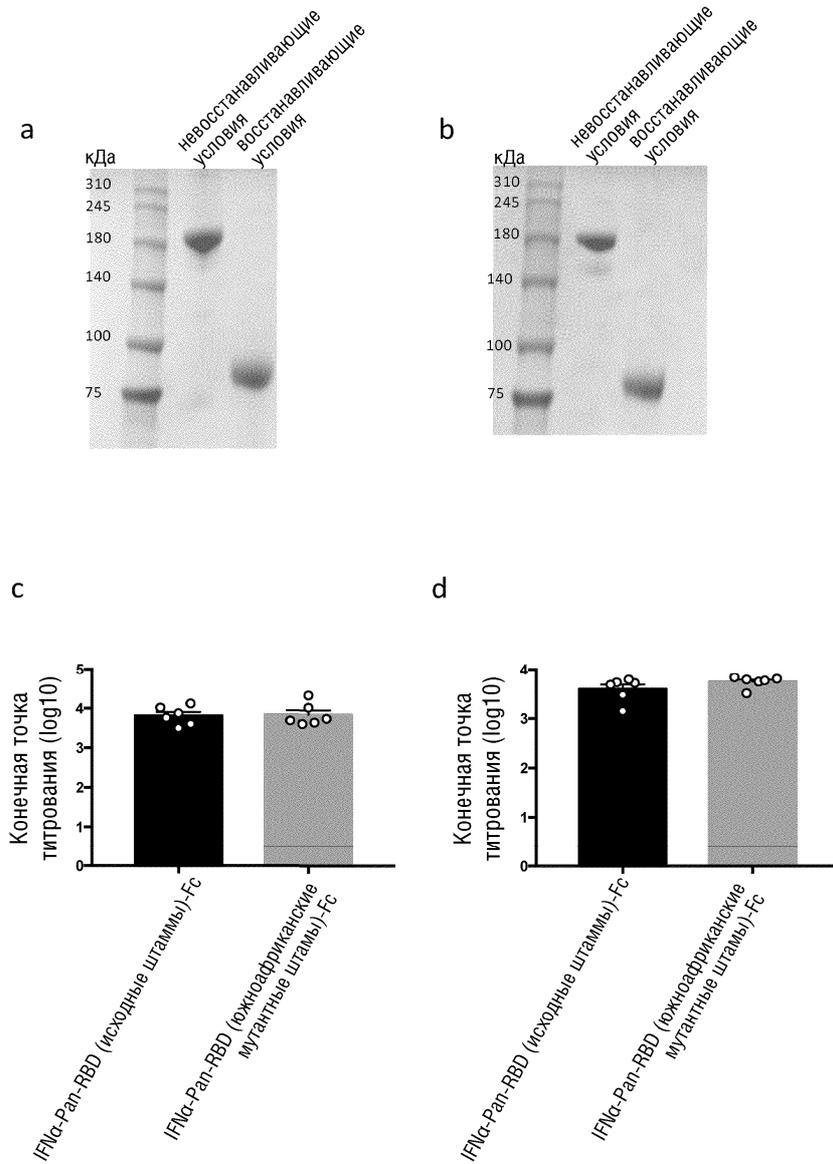
Фиг. 11



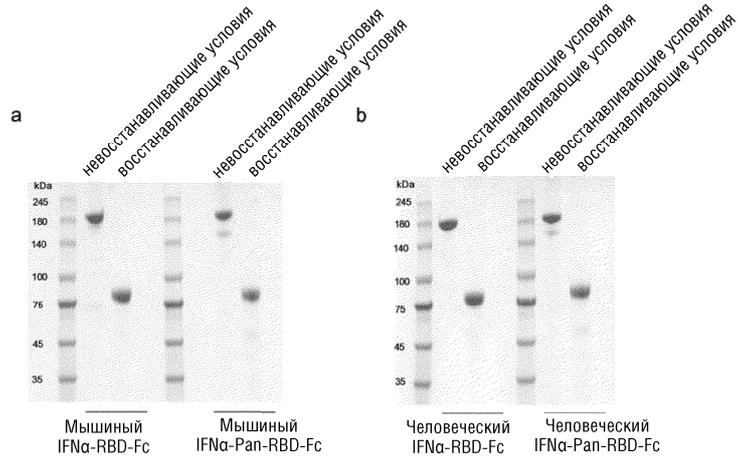
Фиг. 12



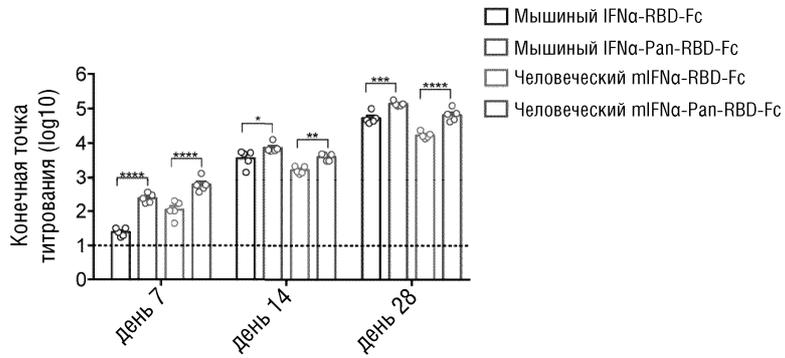
Фиг. 15



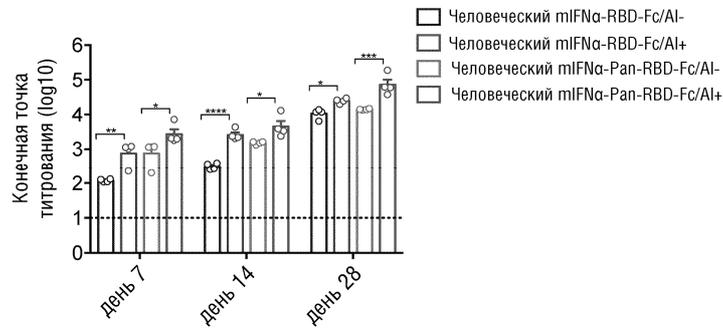
Фиг. 16



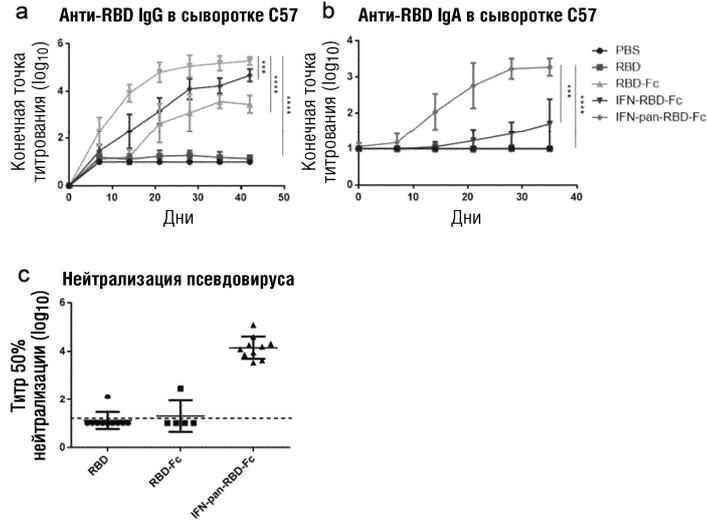
Фиг. 17



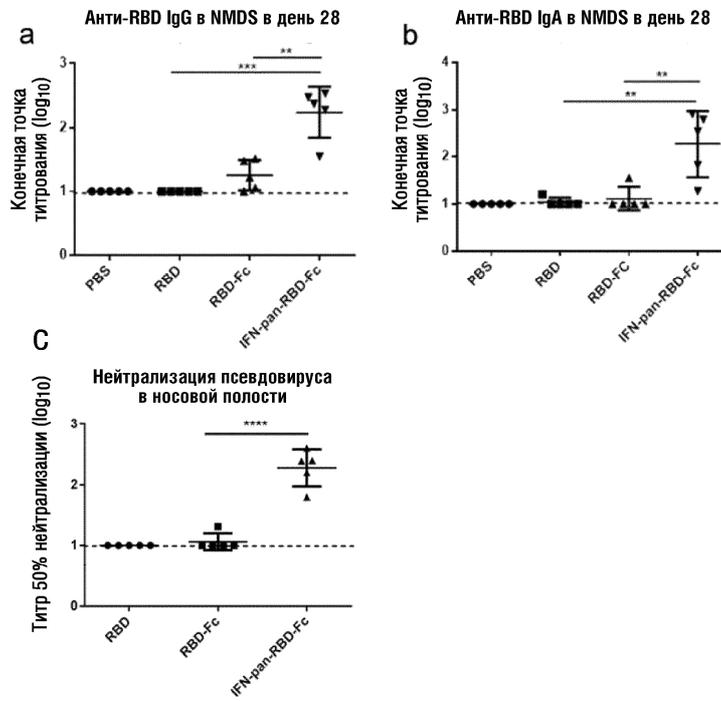
Фиг. 18



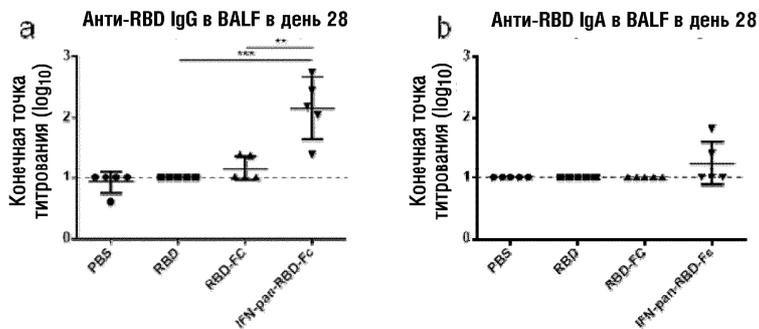
Фиг. 19



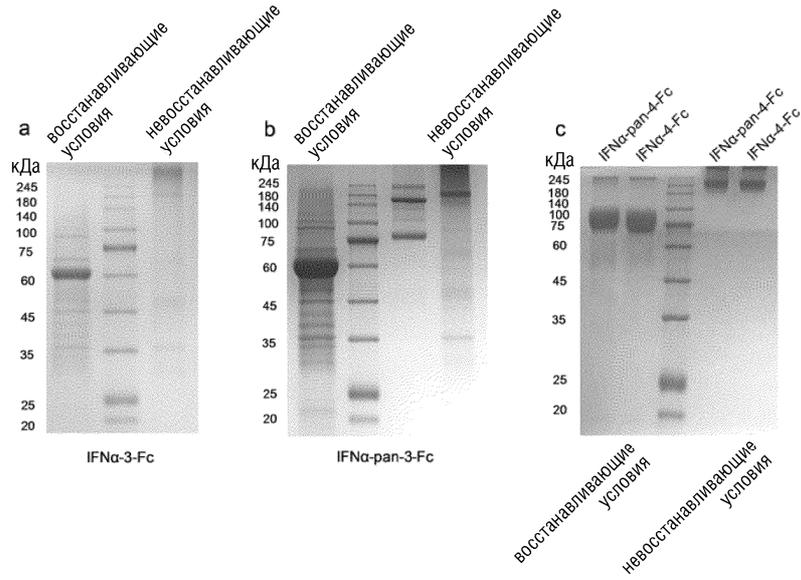
Фиг. 20



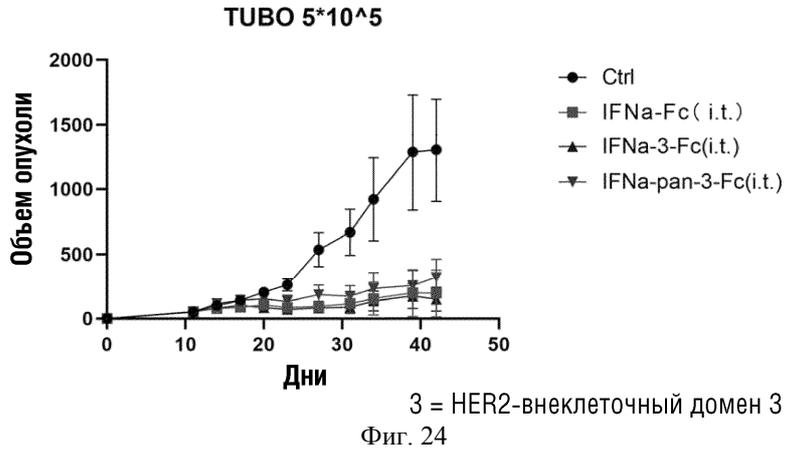
Фиг. 21



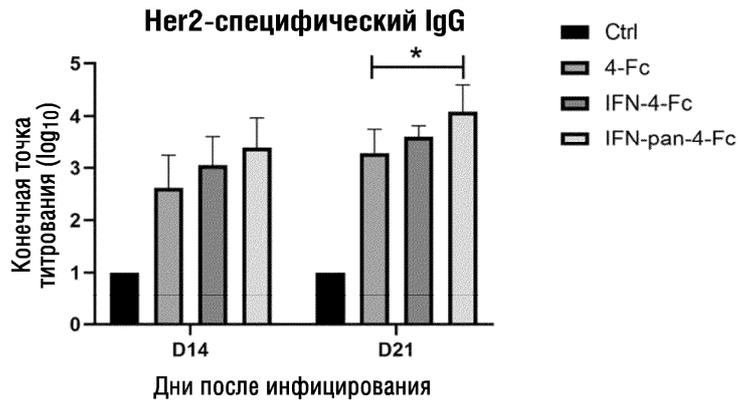
Фиг. 22



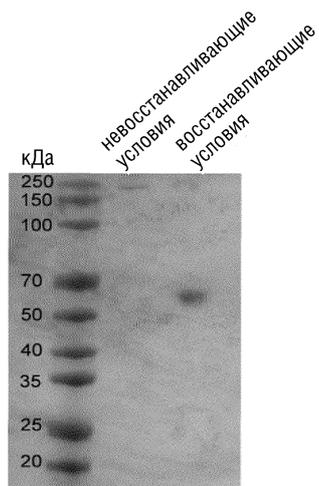
Фиг. 23



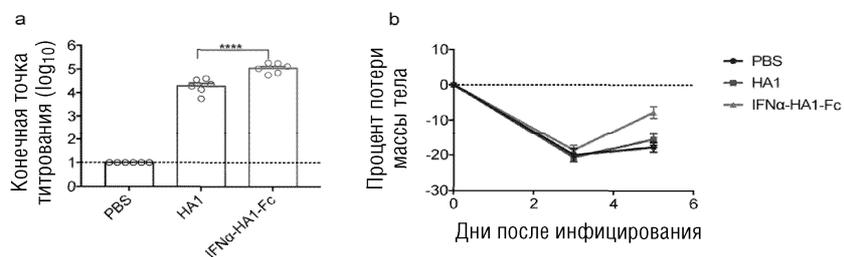
Фиг. 24



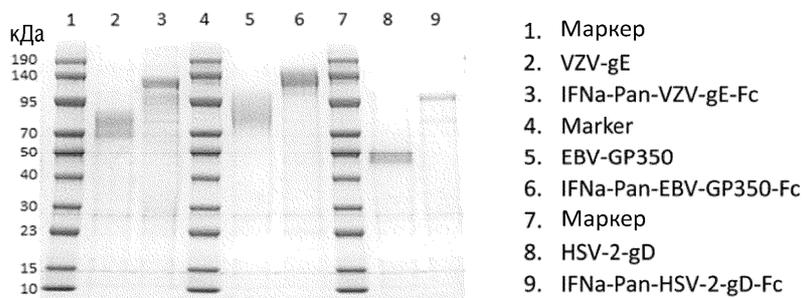
4 = Her2-внеклеточный домен 4
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

