

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202300043 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.31

(51) Int. Cl. C12N 15/861 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.07.07

(54) ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 19
СЕРОТИПА И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 2023109668

(32) 2023.04.16

(33) RU

(71) Заявитель:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)

(72) Изобретатель:

Голдовская Полина Павловна, Попова
Ольга, Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Зрелкин Денис Игоревич, Воронина
Дарья Владимировна, Щепляков
Дмитрий Викторович, Должикова
Инна Вадимовна, Гроусова Дарья
Михайловна, Джаруллаева Алина
Шахмировна, Тухватулин Амир
Ильдарович, Тухватулина Наталья
Михайловна, Щербинин Дмитрий
Николаевич, Есмагамбетов Ильяс
Булатович, Токарская Елизавета
Александровна, Банделюк Алина
Сергеевна, Карпов Андрей Павлович,
Семихин Александр Сергеевич,
Гущин Владимир Алексеевич,
Шмаров Максим Михайлович,
Народицкий Борис Савельевич,
Логунов Денис Юрьевич, Гинцбург
Александр Леонидович (RU)

(57) Группа изобретений относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Создан экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с целевым геном; варибельный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. В частном варианте исполнения экспрессионного вектора константная последовательность до экспрессионной кассеты имеет последовательность SEQ ID NO: 1, а после экспрессионной кассеты имеет последовательность SEQ ID NO: 2. Экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена может содержать SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7. Указанный технический результат также достигается тем, что разработан способ получения экспрессионного вектора, отличающийся тем, что в нем используется челочная плаزمиды, содержащая последовательность, которая гомологична участку генома аденовируса, серотип которого отличается от 19. Также технический результат достигается тем, что разработан способ применения экспрессионного вектора для индукции иммунного ответа к вакцинному антигену. Группа изобретений обеспечивает создание экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа, который способен индуцировать иммунный ответ к вакцинному антигену.

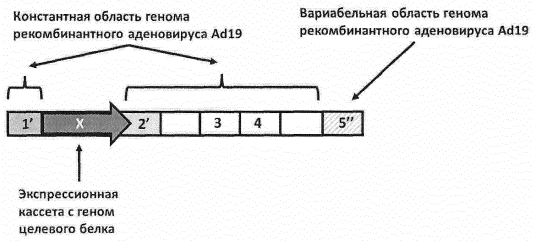
A1

202300043

202300043

A1

Геном рекомбинантного аденовируса человека 19 серотипа (Ad19)



202300043 A1

202300043 A1

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.

Область техники.

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Оно касается рекомбинантных векторов, которые могут быть использованы в фармацевтической промышленности для разработки вакцин.

Уровень техники.

Вакцинация считается одним из наиболее эффективных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Принимая во внимание, что широкая вакцинопрофилактика имеет не столь длительную историю применения, уже к настоящему моменту, считается доказанным факт, что она спасла больше жизней, чем любое другое вмешательство в области общественного здравоохранения. Согласно исследованию, опубликованному в журнале *The Lancet*, иммунизация населения только против 10 патогенов в 98 странах позволила в период 2000–2019 гг. спасти жизни около 37 млн людей.

Вирусные векторы представляют собой относительно новую вакцинную платформу, основанную на использовании рекомбинантных вирусов для доставки генетического материала, кодирующего антиген, в клетки млекопитающих. В настоящее время шесть вакцин на основе вирусных векторов уже разрешены к применению и еще более 100 находятся на разных стадиях доклинических и клинических исследований.

Одним из наиболее востребованных вирусных векторов является вектор на основе рекомбинантного аденовируса. К преимуществам данного типа векторов можно отнести высокую безопасность, широкий диапазон тканевого тропизма, хорошо охарактеризованный геном, высокую пакующую емкость, возможность получения препаратов с высокими титрами и т.д. После введения в организм млекопитающих аденовирусы индуцируют устойчивый Т-клеточный и гуморальный иммунный ответ к вакцинному антигену. Кроме того, данные векторы приводят к активации врожденного иммунитета и не требуют добавления адьюванта в вакцинную композицию.

Среди аденовирусных векторов наиболее изученным является вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа.

Известно решение (CN1276777C), в котором предложена вакцина против тяжелого острого респираторного синдрома на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, содержащего последовательность S белка вируса SARS-CoV.

Известно решение по заявке на изобретение US20080267992A1, где описана вакцина против тяжелого острого респираторного синдрома на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, содержащего последовательность полного протективного антигена S вируса SARS-CoV, или последовательность, которая включает домен S1 антигена S вируса SARS-CoV или домен S2 антигена S вируса SARS-CoV, или оба домена. Кроме того, данный рекомбинантный аденовирус в составе экспрессионной кассеты содержит промотор цитомегаловируса человека (CMV-промотор) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (polyA BGH).

Известно решение CN111218459, в котором разработан экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа, в котором были удалены E1, E3 области, содержащий ген S белка. Данный вектор применяется для создания вакцины против COVID-19.

Однако ограничением к широкому применению векторов на основе аденовируса человека 5 серотипа является наличие у части населения предсуществующего иммунного ответа. В связи с этим актуальным направлением является разработка различных векторов, отличающихся генетически, в том числе на основе аденовирусов других серотипов. Однако из более 80 известных серотипов аденовирусов человека в настоящий момент в качестве экспрессионных векторов используется меньше 10 серотипов.

Таким образом, в области техники существует потребность в разработке новых экспрессионных векторов на основе других серотипов аденовируса.

Осуществление изобретения.

Технической задачей заявленной группы изобретений является расширение арсенала экспрессионных векторов на основе аденовирусов человека.

Технический результат заключается в создании экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа, который способен индуцировать иммунный ответ к вакцинному антигену.

Указанный технический результат достигается тем, что создан экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с целевым геном; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

В частном варианте исполнения экспрессионного вектора константная последовательность до экспрессионной кассеты имеет последовательность SEQ ID NO:1, а после экспрессионной кассеты имеет последовательность SEQ ID NO:2.

Также в частном варианте исполнения экспрессионного вектора экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена содержит ген S белка вируса SARS-CoV2 SEQ ID NO:3.

В другом варианте исполнения экспрессионного вектора экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа A H1N1 SEQ ID NO:4.

Кроме того, представлен вариант исполнения экспрессионного вектора, в котором экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа A H3N2 SEQ ID NO:5.

Кроме того, представлен вариант исполнения экспрессионного вектора, в котором экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа B/Yamagata SEQ ID NO:6.

Кроме того, представлен вариант исполнения экспрессионного вектора, в котором экспрессионная кассета в качестве гена вакцинного антигена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа B/Victoria SEQ ID NO:7.

Указанный технический результат также достигается тем, что разработан способ получения экспрессионного вектора, отличающийся тем, что в нем используется челочная плазида, содержащая последовательность, которая гомологична участку генома аденовируса, серотип которого отличается от 19.

Также технический результат достигается тем, что разработан способ применения экспрессионного вектора для индукции иммунного ответа к вакцинному антигену.

Краткое описание фигур.

На фиг. 1

представлено схематичное изображение экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, вариабельный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. и экспрессионную кассету с целевым геном.

На фиг.2 представлена схема получения плазмиды pAd19-dlE1.

На фиг.3 представлена схема получения плазмиды pAd19-dlE1-dlE3.

На фиг.4 представлена схема получения плазмиды pAd19-dlE1-dlE3-S-nCov.

На фиг. 5 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа полученного экспрессионного вектора Ad19-S-nCov с праймерами, фланкирующими участок гена гексона Ad19 и праймерами, фланкирующими ген S белка SARS-CoV2.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-S-nCov.

На фиг. 6 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа полученных вариантов экспрессионного вектора Ad19-NA-H1, Ad19-NA-H3, Ad19-NA-B(Victoria), Ad19-NA-B(Yamagata) с праймерами, фланкирующими участок гена гексона Ad19.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-NA-H1;
- 6 - Ad19-NA-H3;
- 7 - Ad19-NA-B(Victoria);
- 8 - Ad19-NA-B(Yamagata).

На фиг. 7 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа экспрессионного вектора Ad19-NA-H1 с праймерами, фланкирующими участок гена гемагглютинина вируса гриппа А H1N1.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-NA-H1.

На фиг. 8 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа экспрессионного вектора Ad19-NA-H3 с праймерами, фланкирующими участок гена гемагглютинаина вируса гриппа А H3N2.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-NA-H3.

На фиг. 9 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа экспрессионного вектора Ad19-NA-B(Yamagata) с праймерами, фланкирующими участок гена гемагглютинаина вируса гриппа В Yamagata.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-NA-B(Yamagata).

На фиг. 10 представлена электрофореграмма результатов ПЦР-анализа экспрессионного вектора Ad19-NA-B(Victoria) с праймерами, фланкирующими участок гена гемагглютинаина вируса гриппа В Victoria.

- 1 – Маркер молекулярного веса;
- 2 – Отрицательный контроль;
- 3 – Положительный контроль;
- 4 – Контроль выделения;
- 5 - Ad19-NA-B(Victoria).

Краткое описание нуклеотидных последовательностей:

SEQ ID NO:1 последовательность константной последовательности разработанного экспрессионного вектора до экспрессионной кассеты.

SEQ ID NO:2 последовательность константной последовательности разработанного экспрессионного вектора после экспрессионной кассеты.

SEQ ID NO:3 последовательность гена S белка вируса SARS-CoV-2;

SEQ ID NO:4 последовательность гена гемагглютинаина вируса гриппа А H1N1;

SEQ ID NO:5 последовательность гена гемагглютинина вируса гриппа А H3N2;
SEQ ID NO:6 последовательность гена гемагглютинина вируса гриппа В Yamagata;
SEQ ID NO:7 последовательность гена гемагглютинина вируса гриппа В Victoria;

Реализация изобретения.

Авторы изобретения на основании проведенных исследований определили серотипы аденовирусных векторов, которые настолько отличаются генетически от аденовируса человека 5 серотипа, чтобы при последовательной иммунизации не влиять на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена. Для дальнейшей работы был выбран аденовирус человека 19 серотипа. Затем был отобран вирусный клон, отличающийся повышенными ростовыми свойствами, который в дальнейшем был использован для получения экспрессионного вектора.

Способ получения данного экспрессионного вектора основан на способе получения аденовирусных векторов, описанном в патенте RU 2 731 356 С9, и включает следующие этапы: получение экспрессионной кассеты с целевым геном; получение челночной плазмиды, содержащей экспрессионную кассету с целевым геном; получение плазмиды, содержащей аденовирусный геном и экспрессионную кассету с целевым геном; получение рекомбинантного аденовируса. Главной отличительной особенностью нового метода является использование челночной плазмиды, содержащей области (плечи гомологии), которые только частично гомологичны геному аденовируса человека 19 серотипа. Во время гомологичной рекомбинации между челночной плазмидой и плазмидой, содержащей геном аденовируса человека 19 серотипа с делецией E1 и E3 областей, образуется новая плазида. При этом в последовательность на правом конце генома аденовируса может попасть последовательность (разного размера) из челночной плазмиды, т.к. гомология в данной области ниже 100%. У всех вариантов разработанного экспрессионного вектора данная область немного отличается, поэтому она была названа «вариабельный участок». Схематичное изображение разработанного экспрессионного вектора представлено на фиг.1.

Использование челночной плазмиды с плечами гомологии аденовируса человека 26 серотипа для получения экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 дает преимущество в скорости получения экспрессионного вектора и снижает его себестоимость.

В приведенных ниже примерах проиллюстрировано получение вариантов экспрессионного вектора, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена

содержит ген S белка вируса SARS-CoV-2 или гемагглютинин вируса гриппа. Результаты проведенных экспериментов показывают, что при введении данных вариантов экспрессионного вектора в организм млекопитающих формируется иммунный ответ против соответствующего антигена. Поэтому различные варианты экспрессионного вектора могут быть использованы в составе иммунобиологических средств для профилактики инфекционных заболеваний.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение плазмиды, содержащей геном аденовируса человека 19 серотипа с делецией E1 и E3 областей.

В работе использовали аденовирус человека 19-го серотипа из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России. Данный аденовирус добавляли в культуру клеток почки человеческого эмбриона (НЕК293). Далее клетки культивировали в инкубаторе при температуре 37°C, 5% CO₂ до наступления цитопатического действия (определяли путем микроскопирования). Затем аденовирус выделяли из клеток и концентрировали методом ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия, после чего выделяли вирусную ДНК из вирионов методом фенол-хлороформной экстракции. Нуклеотидная последовательность аденовируса человека 19-го серотипа была определена методом полногеномного секвенирования.

ДНК, выделенную из вирионов аденовируса человека 19-го серотипа, использовали в реакции гомологичной рекомбинации с плазмидой pAd26-Ends (получена в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России), линеаризованной с помощью эндонуклеазы рестрикции MluI. Плазида pAd26-Ends содержит два участка, гомологичных геному аденовируса человека 26 серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 26-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pIX белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4 области до конца генома. Далее проводили трансформацию клеток E.coli штамма BJ5183 полученной смесью. В результате была получена плазида pAd19-dIE1.

На следующем этапе с помощью стандартных генно-инженерных методов была получена плазида p19-dIE3, которая представляет собой челночный вектор, содержащий два плеча гомологии, фланкирующих E3 область. Далее проводили гомологичную

рекомбинацию плазмиды p19-dlE3 и плазмиды pAd19-dlE1, полученной на предыдущем этапе. Для этого обе плазмиды были линейаризованы по уникальным сайтам рестрикции и смешаны. После чего проводили трансформацию клеток E.coli штамма BJ5183 полученной смесью.

В результате проведенной работы была получена pAd19-dlE1-dlE3, содержащая геном аденовируса человека 19 серотипа с делецией E1 и E3 областей.

Пример 2. Способ получения экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа.

Способ получения экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном вакцинного антигена, и переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. состоит из следующих этапов.

Этап 1. Получение экспрессионной кассеты.

На первом этапе необходимо было разработать дизайн экспрессионной кассеты, которая содержит промотор, целевой ген и сигнал полиаденилирования. Кроме того, в состав экспрессионной кассеты может входить полилинкерная последовательность, необходимая для генно-инженерных манипуляций. В качестве промотора авторы использовали промотор цитомегаловируса человека (CMV). Однако, специалисту среднего уровня очевидно, что в качестве промотора в данной экспрессионной кассете может быть использован любой из известных промоторов, обеспечивающих экспрессию целевого гена.

В качестве целевого гена может быть использована последовательность любого вакцинного антигена, в том числе модифицированная. В данном примере авторы использовали оптимизированные последовательности гена S белка вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO:3), гена гемагглютинина вируса гриппа A H1N1 (SEQ ID NO:4), гена гемагглютинина вируса гриппа A H3N2 (SEQ ID NO:5), гена гемагглютинина вируса гриппа B/Yamagata (SEQ ID NO:6) и гена гемагглютинина вируса гриппа B/Victoria (SEQ ID NO:7).

В качестве сигнала полиаденилирования в данных примерах был использован сигнал позднего полиаденилирования SV40.

Фрагменты экспрессионной кассеты были синтезированы ЗАО «Евроген» и собраны в ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» с помощью стандартных генно-инженерных методик. Таким образом, были получены следующие экспрессионные кассеты:

- 1) Экспрессионная кассета, которая в качестве целевого гена содержит ген S белка вируса SARS-CoV-2 SEQ ID NO:3.
- 2) Экспрессионная кассета, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа А H1N1 SEQ ID NO:4.
- 3) Экспрессионная кассета, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа А H3N2 SEQ ID NO:5.
- 4) Экспрессионная кассета, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа В/Yamagata SEQ ID NO:6.
- 5) Экспрессионная кассета, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа В/Victoria SEQ ID NO:7.

Этап 2. Получение челночной плазмиды, содержащей экспрессионную кассету.

В работе использовали плазмиду pAd26-Ends (получена в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России), которая содержит участки, гомологичные геному аденовируса человека 26 серотипа.

На основе плазмиды pAd26-Ends генно-инженерным методом были получены конструкции, содержащие экспрессионные кассеты, полученные на предыдущем этапе, а также несущие участки, гомологичные геному аденовируса человека 26 серотипа. Таким образом, были получены плазмиды:

- 1) pArms-26-S-nCoV с экспрессионной кассетой, которая в качестве целевого гена содержит ген S белка вируса SARS-CoV-2 SEQ ID NO:3.
- 2) pArms-26-NA-H1 с экспрессионной кассетой, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа А H1N1 SEQ ID NO:4.
- 3) pArms-26-NA-H3 с экспрессионной кассетой, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа А H3N2 SEQ ID NO:5.
- 4) pArms-26-NA-B(Yamagata) с экспрессионной кассетой, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа В/Yamagata SEQ ID NO:6.
- 5) pArms-26-NA-B(Victoria) с экспрессионной кассетой, которая в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинина вируса гриппа В/Victoria SEQ ID NO:7.

Этап 3. Получение плазмиды, содержащей геном аденовируса 19 серотипа и экспрессионную кассету с целевым геном.

Конструкции pArms-26-S-nCoV, pArms-26-NA-H1, pArms-26-NA-H3, pArms-26-NA-B(Yamagata), pArms-26-NA-B(Victoria), полученные на предыдущем этапе, линейаризовали

по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии. Затем каждую плазмиду смешивали с лианеризованной плазмидой pAd19-dlE1-dlE3. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd19-dlE1-dlE3-S-nCoV, pAd19-dlE1-dlE3-NA-H1, pAd19-dlE1-dlE3-NA-H3, pAd19-dlE1-dlE3-NA-B(Yamagata), pAd19-dlE1-dlE3-NA-B(Victoria). Данные плазмиды помимо экспрессионной кассеты несут геном аденовируса человека 19 серотипа с делецией E1 и E3-областей. Однако за счет того, что рекомбинация каждый раз происходила между двумя плазмидами, содержащими плечи гомологии от аденовирусов разных серотипов, образовалась переменная область. В данную область может попасть последовательность (разного размера) из челночной плазмиды, т.к. гомология в данной области ниже 100%. При получении каждого экспрессионного вектора с новым целевым геном данная область может меняться.

Этап 4. Получение рекомбинантного аденовируса.

На последнем этапе плазмиды pAd19-dlE1-dlE3-S-nCoV, pAd19-dlE1-dlE3-NA-H1, pAd19-dlE1-dlE3-NA-H3, pAd19-dlE1-dlE3-NA-B(Yamagata), pAd19-dlE1-dlE3-NA-B(Victoria) гидролизировали специфическими эндонуклеазами рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293.

В результате был получен экспрессионный вектор, на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей (SEQ ID NO:1), переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. и экспрессионную кассету с целевым геном S белка вируса SARS-CoV-2 SEQ ID NO:3 (Ad19-S-nCoV), или геном гемагглютинаина вируса гриппа А H1N1 SEQ ID NO:4 (Ad19-NA-H1), или геном гемагглютинаина вируса гриппа А H3N2 SEQ ID NO:5 (Ad19-NA-H3), или геном гемагглютинаина вируса гриппа В/Yamagata SEQ ID NO:6 (Ad19-NA-B(Yamagata)), или геном гемагглютинаина вируса гриппа В/Victoria SEQ ID NO:7 (Ad19-NA-B(Victoria)).

Пример 3. Оценка подлинности полученных вариантов разработанного экспрессионного вектора.

Для проверки подлинности полученных вариантов разработанного экспрессионного вектора использовали метод ПЦР. Для каждого образца вируса использовали праймеры, комплементарные фрагменту генома аденовируса, и уникальные праймеры на целевой ген:

- 1) образец ДНК: Ad19-S-nCoV

праймеры, фланкирующие участок векторной части экспрессионного вектора:

hexon19-прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC

hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTAAAG

праймеры, фланкирующие участок гена S белка SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования SV40:

Nov-S-F AAGAATTCACCACCGCTCCA

SV40-R GTGGTATGGCTGATTATGATC

Результаты ПЦР анализа представлены на фиг.5.

2) образец ДНК: Ad19-NA-N1

праймеры, фланкирующие участок векторной части экспрессионного вектора:

hexon19-прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC

hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTAAAG

праймеры, фланкирующие участок гена гемагглютинина вируса гриппа гемагглютинина вируса гриппа H1N1:

hexon19- прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC

hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTAAAG

H1-прямой GGGCATTCACCATCCTCC

H1-обратный CAGGTTTCCAGTTGCTTCG

Результаты ПЦР анализа представлены на фиг.6-7.

3) образец ДНК: Ad19-NA-N3

hexon19- прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC

hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTAAAG

N3-прямой: TCCCGAGAAACAGACCCG

N3-обратный: GCCGATTCAGCTTCCCAT

Результаты ПЦР анализа представлены на фиг.6-8.

4) образец ДНК: Ad19-NA-B(Yamagata)

hexon19- прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC

hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTAAAG

B-PH-прямой: CTTGGACAGGATTGCTGCA

B-PH-обратный: TCTGCTCACCATGTAGACG

Результаты ПЦР анализа представлены на фиг.6-9.

5) Ad19-NA-B(Victoria)

hexon19- прямой: AGAAACAGCCGATAATCCTCC
hexon19-обратный: ATCGATATTGTCACCAGTTTTAAG
В-aus-прямой: TCTGCGGGCTGATACAATAAG
В-aus-обратный: GCTAAATTCTCCTGCATCAAAG

Результаты ПЦР анализа представлены на фиг.5.

Для проведения ПЦР использовали набор 5X ScreenMix-HS (Евроген, Россия). Готовили реакционную смесь из расчета для 1 пробы: 5-кратная смесь (Евроген, Россия) 4 мкл, по 0,1 мкл каждого праймера, 14,8 мкл деионизированной воды, 1 мкл образца ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). Продукты амплификации анализировали в горизонтальном геле электрофорезе с помощью системы детектирования гелей Gel-Doc EZ Imager (Bio-Rad, США). Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия).

Как видно из полученных данных в каждом экспериментальном образце были обнаружена ДНК аденовируса человека 19 серотипа и целевой ген.

Таким образом, результаты эксперимента подтверждают получение экспрессионных векторов на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. и экспрессионную кассету с целевым геном.

Пример 4. Оценка иммуногенности разработанного экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном S белка вируса SARS; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

Целью данного эксперимента являлось определение способности разработанного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном S белка вируса SARS; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. (Ad19-S-nCov), индуцировать развитие гуморального иммунного ответа у млекопитающих.

В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против S белка вируса SARS через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных Ad19-S-nCov мышей линии C57BL/6, самки 18г. Все животные были разделены на 7 групп по 6 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad19-S-nCov 10^8 БОЕ/мышь
- 2) Ad19-S-nCov 10^9 БОЕ/мышь
- 3) Ad19-S-nCov 10^{10} БОЕ/мышь
- 4) Ad19-null 10^8 БОЕ/мышь
- 5) Ad19-null 10^9 БОЕ/мышь
- 6) Ad19-null 10^{10} БОЕ/мышь
- 7) фосфатно-солевой буфер

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу:

- 1) Белок (S) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществилась "забивка" планшета 5 % молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с

помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Титр антител к белку S в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 1.

Группа	Титр антител
Ad19-S-nCov 10 ⁸ БОЕ/мышь	713
Ad19-S-nCov 10 ⁹ БОЕ/мышь	2851
Ad19-S-nCov 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	32254
Ad19-null 10 ⁸ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ⁹ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	0
фосфатно-солевой буфер	0

Результаты эксперимента показали, что разработанный экспрессионный вектор, на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, варибельный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. и экспрессионную кассету с геном S белка вируса SARS-CoV2, введенный в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к S белку SARS-CoV-2 во всем диапазоне выбранных доз. При этом, очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 5. Оценка иммуногенности разработанного экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинаина вируса гриппа А H1N1; варибельный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

Целью данного эксперимента являлось определение способности разработанного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную

последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинина вируса гриппа А H1N1; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. (Ad19-NA-H1), индуцировать развитие гуморального иммунного ответа у млекопитающих.

В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гемагглютинина вируса гриппа А H1N1 через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных Ad19-NA-H1 мышью линии C57BL/6, самки 18г. Все животные были разделены на 7 групп по 6 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad19-NA-H1, 10^8 БОЕ/мышь
- 2) Ad19-NA-H1, 10^9 БОЕ/мышь
- 3) Ad19-NA-H1, 10^{10} БОЕ/мышь
- 4) Ad19-null, 10^8 БОЕ/мышь
- 5) Ad19-null, 10^9 БОЕ/мышь
- 6) Ad19-null, 10^{10} БОЕ/мышь
- 7) фосфатно-солевой буфер

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу:

- 1) Гемагглютинин вируса гриппа А H1N1 адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществилась "забивка" планшета 5 % молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное

соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Титр антител к гемагглютинирующему вирусу гриппа А Н1N1 в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 2.

Группа	Титр антител
Ad19-NA-N1 10 ⁸ БОЕ/мышь	504
Ad19-NA-N1 10 ⁹ БОЕ/мышь	1600
Ad19-NA-N1 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	28735
Ad19-null 10 ⁸ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ⁹ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	0
фосфатно-солевой буфер	0

Результаты эксперимента показали, что разработанный экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинирующего вируса гриппа А Н1N1, и переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о., введенный в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к гемагглютинирующему вирусу гриппа А Н1N1 во всем диапазоне выбранных доз. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 6. Оценка иммуногенности разработанного экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинирующего вируса гриппа А Н3N2; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

Целью данного эксперимента являлось определение способности разработанного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинаина вируса гриппа А H3N2; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.(Ad19-NA-H3), индуцировать развитие гуморального иммунного ответа у млекопитающих.

В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гемагглютинаина вируса гриппа А H3N2 через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных экспрессионным вектором Ad19-NA-H3 мышей линии C57BL/6, самки 18г. Все животные были разделены на 7 групп по 5 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad19-NA-H3, 10^8 БОЕ/мышь
- 2) Ad19-NA-H3, 10^9 БОЕ/мышь
- 3) Ad19-NA-H3, 10^{10} БОЕ/мышь
- 4) Ad19-null, 10^8 БОЕ/мышь
- 5) Ad19-null, 10^9 БОЕ/мышь
- 6) Ad19-null, 10^{10} БОЕ/мышь
- 7) фосфатно-солевой буфер

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу:

- 1) Гемагглютинин вируса гриппа А H3N2 адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5 % молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.

- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C.
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Титр антител к гемагглютинирующему вирусу гриппа А Н3N2 в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 3.

Группа	Титр антител
Ad19-NA-N3 10 ⁸ БОЕ/мышь	2016
Ad19-NA-N3 10 ⁹ БОЕ/мышь	5080
Ad19-NA-N3 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	36204
Ad19-null 10 ⁸ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ⁹ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	0
фосфатно-солевой буфер	0

Результаты эксперимента показали, что разработанный экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинирующего вируса гриппа А Н3N2, и переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о., введенный в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к гемагглютинирующему вирусу гриппа А Н3N2 во всем диапазоне выбранных доз. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 7. Оценка иммуногенности разработанного экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную

последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинаина вируса гриппа В Yamagata; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

Целью данного эксперимента являлось определение способности разработанного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинаина вируса гриппа В Yamagata; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.(Ad19-NA-B(Yamagata)), индуцировать развитие гуморального иммунного ответа у млекопитающих.

В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гемагглютинаина вируса гриппа В/Yamagata через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных экспрессионным вектором Ad19-NA-B(Yamagata) мышей линии C57BL/6, самки 18г. Все животные были разделены на 7 групп по 6 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad19-NA-B(Yamagata), 10^8 БОЕ/мышь
- 2) Ad19-NA-B(Yamagata), 10^9 БОЕ/мышь
- 3) Ad19-NA-B(Yamagata), 10^{10} БОЕ/мышь
- 4) Ad19-null, 10^8 БОЕ/мышь
- 5) Ad19-null, 10^9 БОЕ/мышь
- 6) Ad19-null, 10^{10} БОЕ/мышь
- 7) фосфатно-солевой буфер

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу:

- 1) Гемагглютинин вируса гриппа В/Yamagata адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществилась "забивка" планшета 5 % молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .

- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C.
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Титр антител к гемагглютинуину вируса гриппа В/Yamagata в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 4.

Группа	Титр антител
Ad19-NA-B(Yamagata)10 ⁸ БОЕ/мышь	283
Ad19-NA-B(Yamagata)10 ⁹ БОЕ/мышь	2263
Ad19-NA-B(Yamagata)10 ¹⁰ БОЕ/мышь	10159
Ad19-null 10 ⁸ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ⁹ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	0
фосфатно-солевой буфер	0

Результаты эксперимента показали, что разработанный экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютиниона вируса гриппа В Yamagata, и переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о., введенный в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к гемагглютинуину вируса гриппа В Yamagata во всем диапазоне выбранных доз. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 8. Оценка иммуногенности разработанного экспрессионного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинина вируса гриппа В Victoria; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.

Целью данного эксперимента являлось определение способности разработанного вектора на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащего: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинина вируса гриппа В Victoria; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о. (Ad19-НА-В(Victoria)), индуцировать развитие гуморального иммунного ответа у млекопитающих.

В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гемагглютинина вируса гриппа В/ Victoria через 21 день после однократной внутримышечной иммунизации животных экспрессионным вектором Ad19-НА-В(Victoria) мышей линии C57BL/6, самки 18г. Все животные были разделены на 7 групп по 6 животных, которым внутримышечно вводили:

- 1) Ad19-НА-В(Victoria), 10^8 БОЕ/мышь
- 2) Ad19-НА-В(Victoria), 10^9 БОЕ/мышь
- 3) Ad19-НА-В(Victoria), 10^{10} БОЕ/мышь
- 4) Ad19-null, 10^8 БОЕ/мышь
- 5) Ad19-null, 10^9 БОЕ/мышь
- 6) Ad19-null, 10^{10} БОЕ/мышь
- 7) фосфатно-солевой буфер

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу:

- 1) Гемагглютинин вируса гриппа В/ Victoria адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5 % молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.

- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C.
- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C.
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Титр антител к гемагглютинирующему вирусу гриппа В/ Victoria в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 5.

Группа	Титр антител
Ad19-NA-B(Victoria) 10 ⁸ БОЕ/мышь	566
Ad19-NA-B(Victoria)10 ⁹ БОЕ/мышь	2016
Ad19-NA-B(Victoria) 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	20319
Ad19-null 10 ⁸ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ⁹ БОЕ/мышь	0
Ad19-null 10 ¹⁰ БОЕ/мышь	0
фосфатно-солевой буфер	0

Результаты эксперимента показали, что разработанный экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с геном гемагглютинирующего вируса гриппа В Victoria, и варибельный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о., введенный в организм млекопитающего, индуцирует гуморальный иммунный ответ к гемагглютинирующему вирусу

гриппа В Victoria во всем диапазоне выбранных доз. При этом очевидно, что увеличение доз будет приводить к увеличению титра антител в крови млекопитающих до наступления токсического эффекта.

Пример 9. Проверка безопасности разработанных вариантов экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа.

Целью данного эксперимента являлась проверка токсичности разработанного экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа при однократном внутримышечном введении (острая токсичность) на мышах.

В исследовании были использованы аутбредные мыши, обоих полов, массой 18-20 грамм, возрастом 6-8 недель.

Минимальной дозой для токсикологических экспериментов была выбрана доза для мыши 10^8 в.ч., как наиболее близкая к терапевтической. Для пересчета доз не использовался коэффициент межвидового пересчета, дозы получены путем прямого пересчета на массу тела, согласно рекомендации ВОЗ для вакцинных препаратов.

В результате, для введения мышам в данном эксперименте выбрали следующие дозы средства:

- 10^9 в.ч. – увеличенная эффективная доза (ЭД) для мышей в 20 раз;
- 10^{10} в.ч. – увеличенная ЭД для мышей в 200 раз;
- 10^{11} в.ч. – увеличенная ЭД для мышей в 2000 раз;

Таким образом, были получены следующие экспериментальные группы животных:

- 1) Ad19-S-nCov, 10^9 в.ч./мышь, 20 мышей;
- 2) Ad19-S-nCov, 10^{10} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 3) Ad19-S-nCov, 10^{11} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 4) Ad19-NA-N1, 10^9 в.ч./мышь, 20 мышей;
- 5) Ad19-NA-N1, 10^{10} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 6) Ad19-NA-N1, 10^{11} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 7) Ad19-NA-N3, 10^9 в.ч./мышь, 20 мышей;
- 8) Ad19-NA-N3, 10^{10} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 9) Ad19-NA-N3, 10^{11} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 10) Ad19-NA-B(Yamagata), 10^9 в.ч./мышь, 20 мышей;

- 11) Ad19-НА-В(Yamagata), 10^{10} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 12) Ad19-НА-В(Yamagata), 10^{11} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 13) Ad19-НА-В(Victoria), 10^9 в.ч./мышь, 20 мышей;
- 14) Ad19-НА-В(Victoria), 10^{10} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 15) Ad19-НА-В(Victoria), 10^{11} в.ч./мышь, 20 мышей;
- 16) Фосфатно-солевой буферный раствор, 20 мышей.

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно в течение 14 дней, регистрируя признаки интоксикации и число павших животных.

Фиксировали следующие параметры функционального состояния лабораторных животных: активность, передвижение, внешний вид, состояние шерсти, глаз, ушей, зубов, конечностей. Физиологические функции: дыхание, слюноотделение, слюна, моча, экскрет. -На протяжении эксперимента все животные оставались живы. Во всех группах животные выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы обычного цвета, без поломок. Мыши были средней упитанности, истощением не страдали. Область живота в объеме не увеличена. Дыхание ровное, незатрудненное. Слюноотделение в норме. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлекс соответствовали физиологической норме. Поведение опытных животных не отличалось от контрольных.

На 14 сутки от начала эксперимента, осуществляли запланированную эвтаназию мышей методом дислокации шейных позвонков. В ходе проведения исследования животные в тяжелом состоянии с признаками неминуемой смерти не наблюдались, гибели животных не было.

Проводили полную некропсию тел всех животных. При некропсии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему.

При макроскопическом исследовании не обнаружено влияния средства на состояние внутренних органов мышей, различий между контрольными и опытными группами не найдено. Статистически достоверных различий в массе органов между опытными и

контрольной группами не обнаружено. Набор массы животных в опытных и контрольных группах не отличался.

Таким образом, в ходе проведенной работы определяли безопасность разработанных средств путем оценки острой токсичности. Исходя из полученных данных, можно заключить, что все исследованные варианты экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа безопасны.

Промышленная применимость

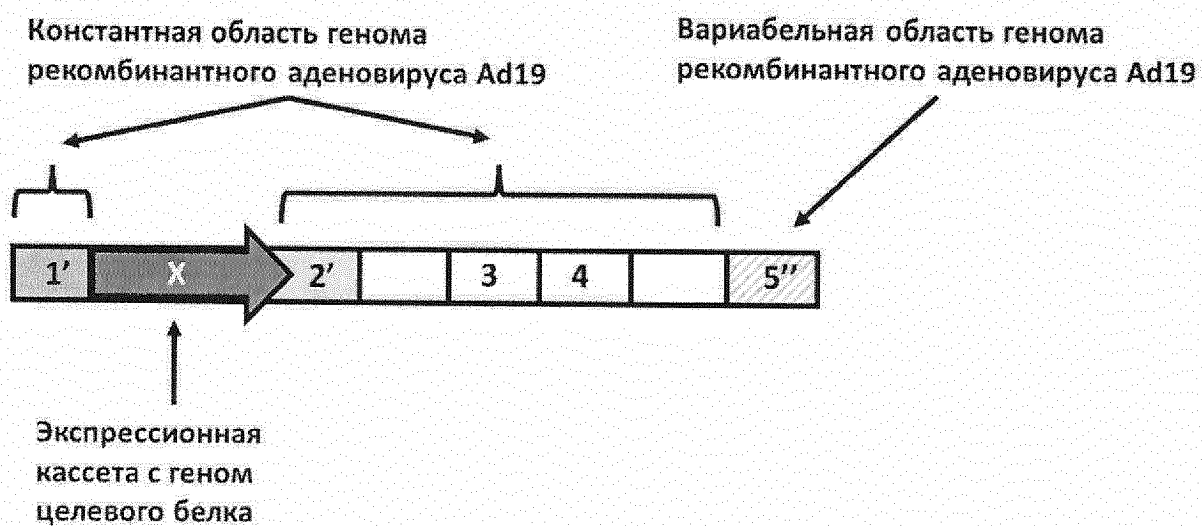
Все приведенные примеры подтверждают способность разработанного экспрессионного вектора на основе аденовируса человека 19 серотипа индуцировать гуморальный ответ против целевого антигена и его промышленную применимость для создания вакцин против различных инфекционных заболеваний.

Формула изобретения

1. Экспрессионный вектор на основе генома аденовируса человека 19 серотипа, содержащий: константную последовательность с делецией E1 и E3 областей, внутри которой находится экспрессионная кассета с целевым геном; переменный участок на правом конце генома размером до 1000 п.о.
2. Экспрессионный вектор по п.1, в котором константная последовательность имеет последовательность SEQ ID NO:1 до экспрессионной кассеты и последовательность SEQ ID NO:2 после экспрессионной кассеты.
2. Экспрессионный вектор по п.1, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена содержит ген S белка вируса SARS-CoV-2 SEQ ID NO:3.
3. Экспрессионный вектор по п.1, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа A H1N1 SEQ ID NO:4.
4. Экспрессионный вектор по п.1, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа A H3N2 SEQ ID NO:5.
5. Экспрессионный вектор по п.1, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа B/Yamagata SEQ ID NO:6.
6. Экспрессионный вектор по п.1, в котором экспрессионная кассета в качестве целевого гена содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа B/Victoria SEQ ID NO:7.
7. Способ получения экспрессионного вектора по п.1, отличающийся тем, что в нем используется челночная плаزمиды, содержащая последовательность, которая гомологична участку генома аденовируса, серотип которого отличается от 19.
7. Способ применения экспрессионного вектора по п.1 для индукции иммунного ответа к целевому антигену.

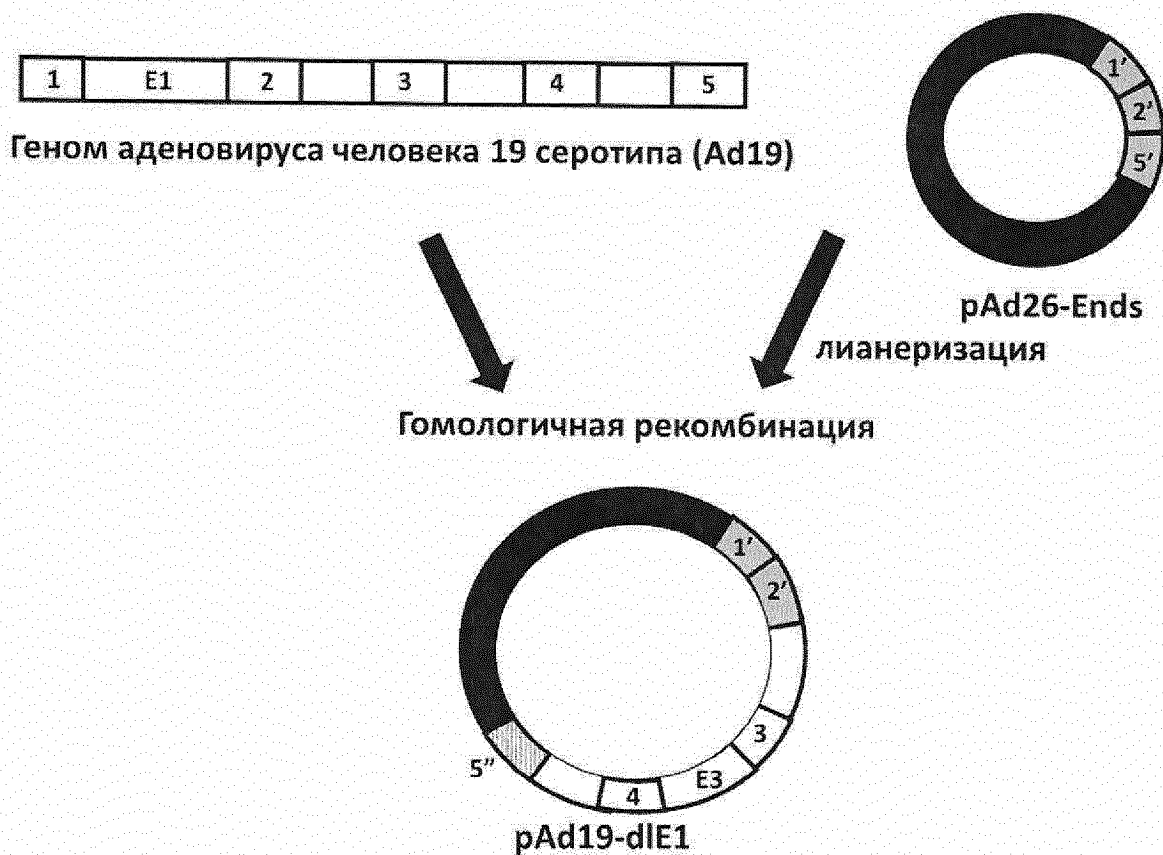
Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.

Геном рекомбинантного аденовируса человека 19 серотипа (Ad19)



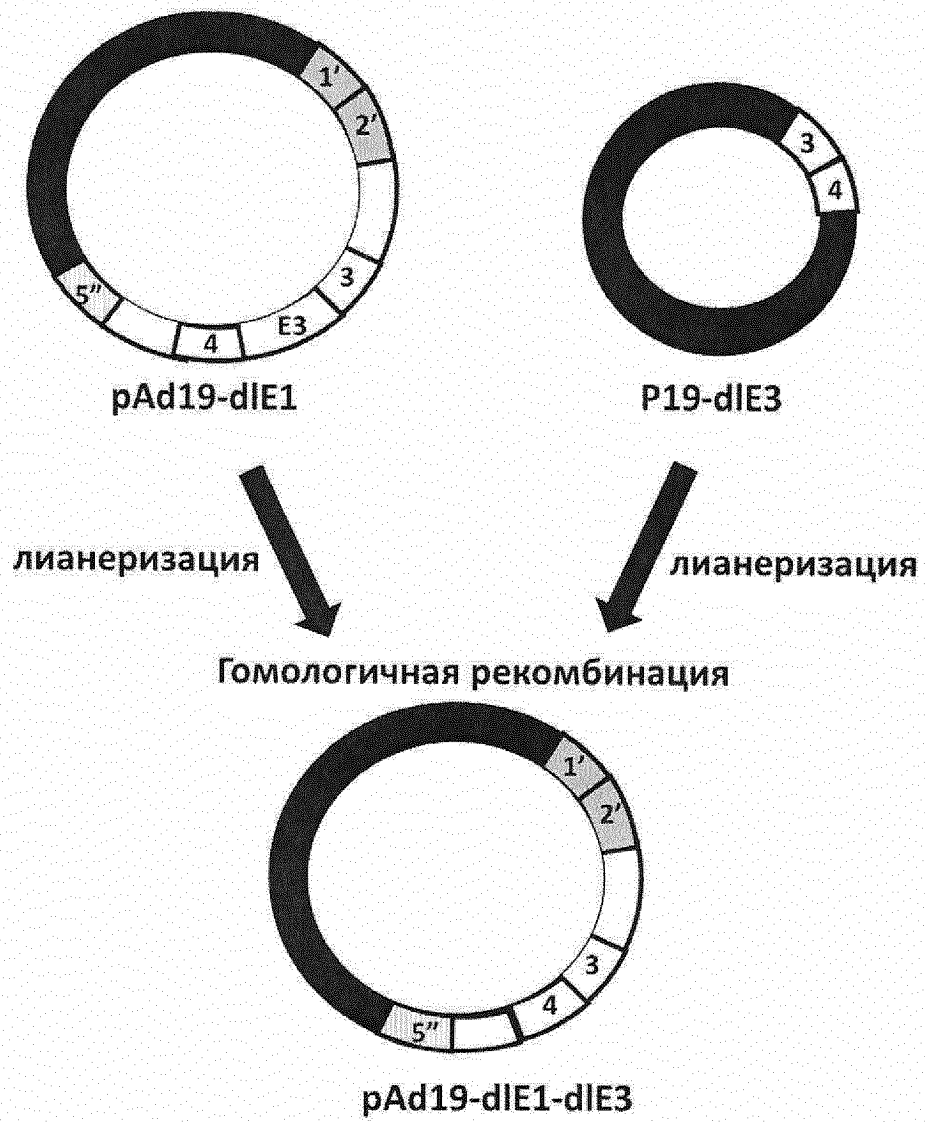
Фиг.1

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



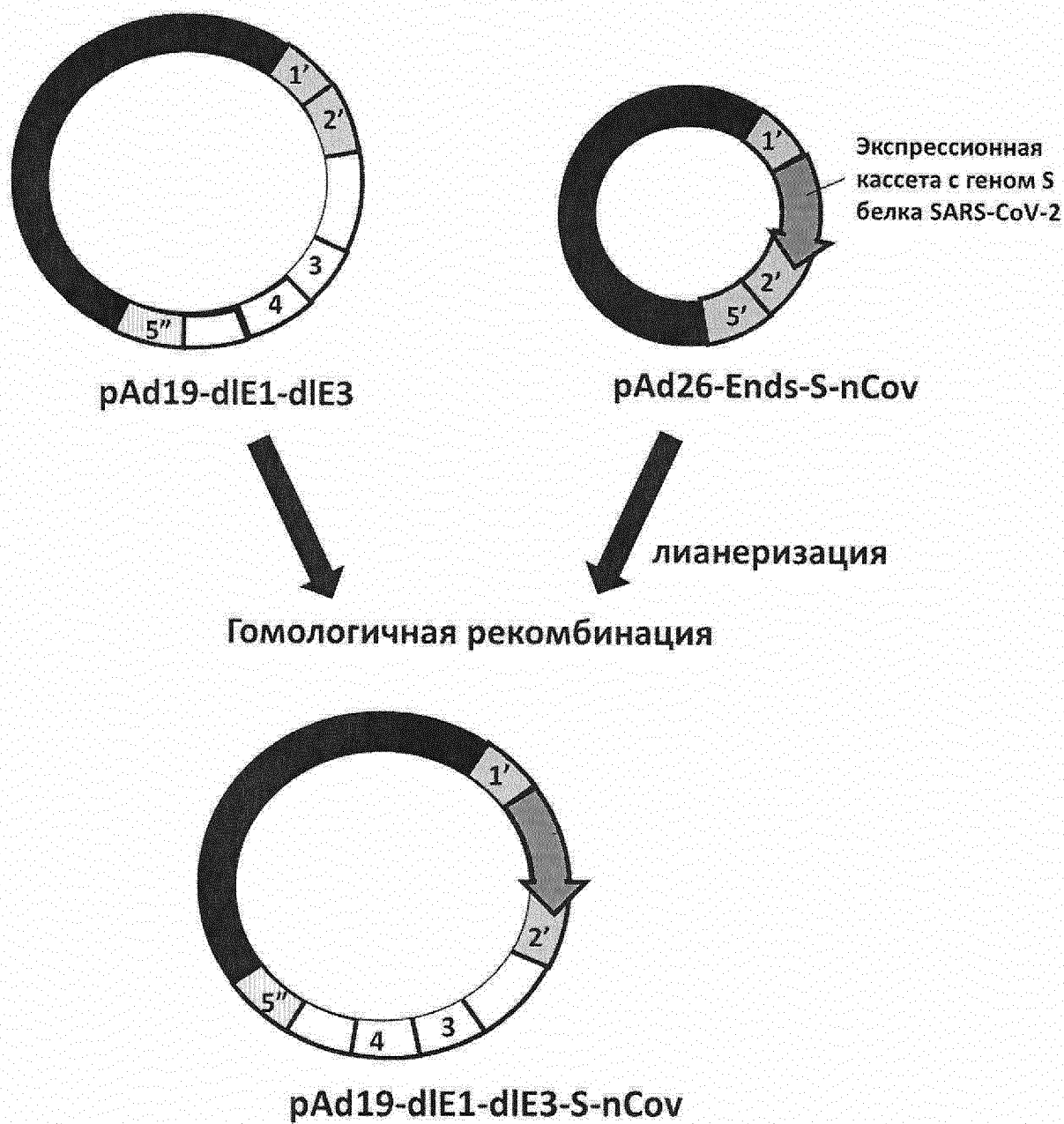
Фиг.2

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



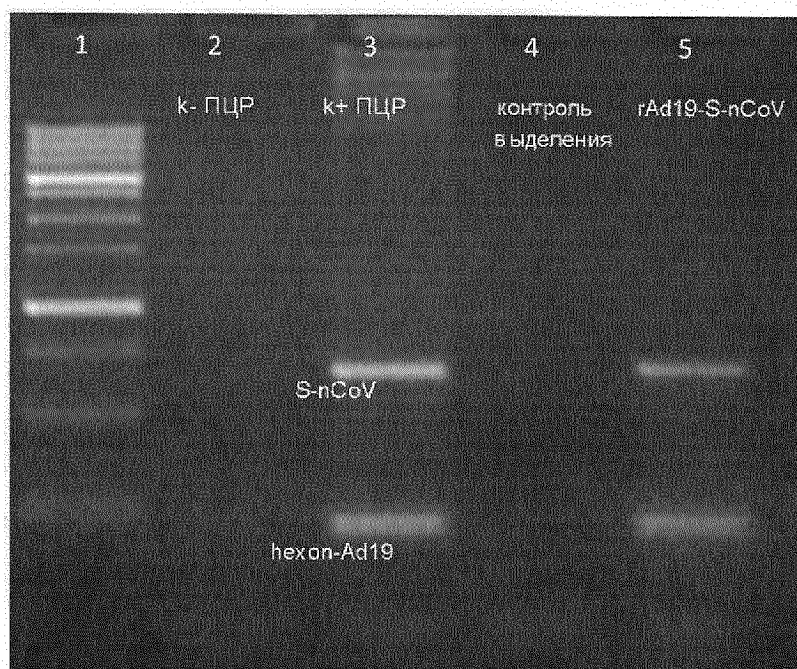
Фиг.3

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



Фиг.4

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



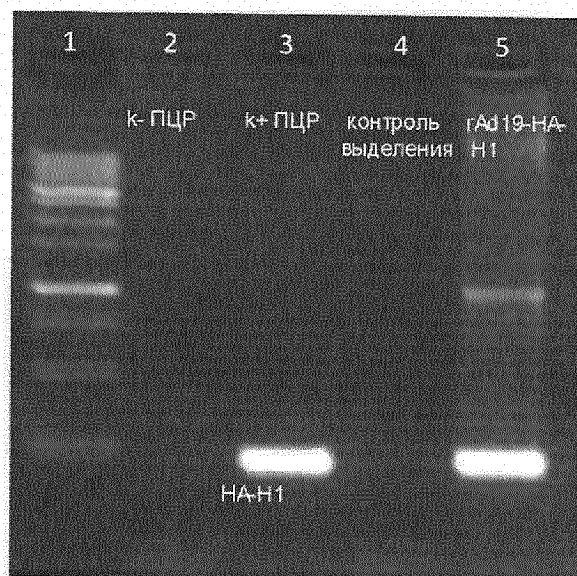
Фиг.5

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



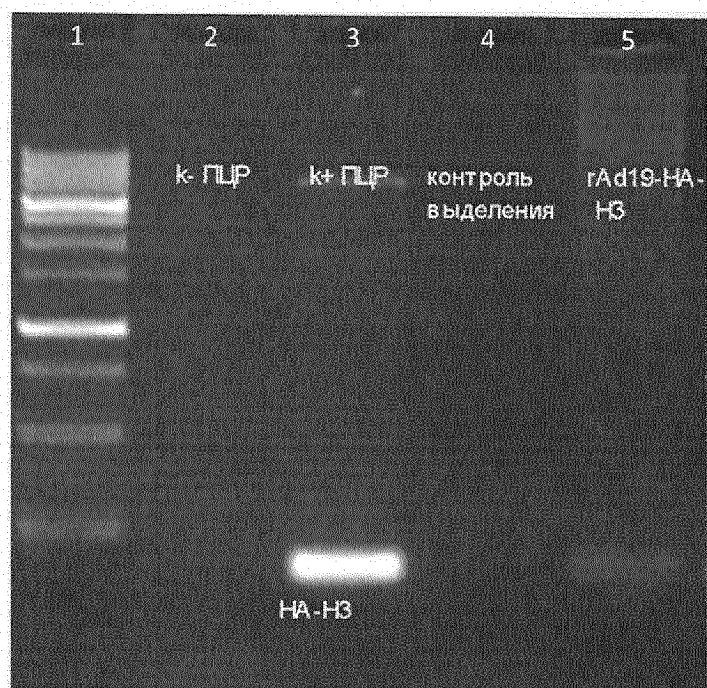
Фиг.6

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



Фиг.7

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



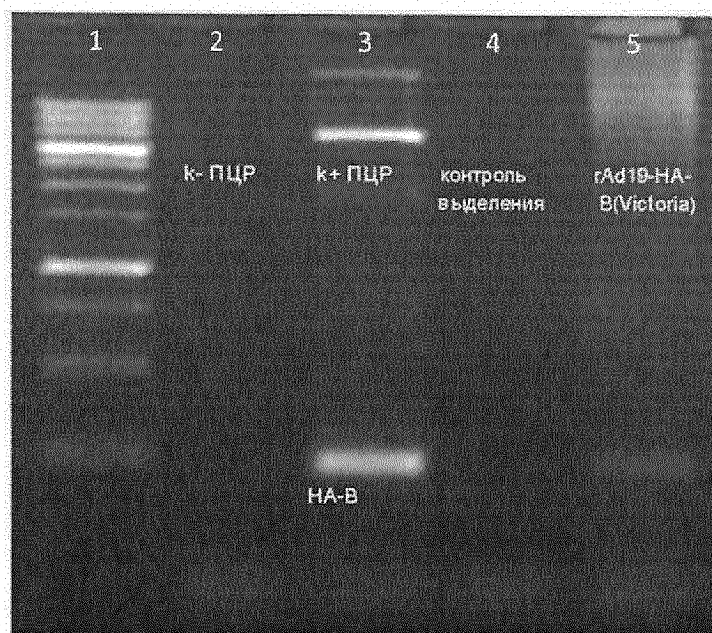
Фиг.8

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



Фиг.9

Экспрессионный вектор на основе аденовируса человека 19 серотипа и способ его применения.



Фиг.10

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202300043А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C12N 15/861, A61K 39/145, A61K 39/215, A61P 31/14, A61P 31/16

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, PATENTSCOPE, E-Library, EMBL-EBI, PubMed, USPTO, ScienceDirect

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	LAPUENTE D. et al. Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization. NATURE COMMUNICATIONS. 2021, Vol.12, No.6871, p.1-14 doi: 10.1038/s41467-021-27063-4 Abstract, с.7-10, раздел «Discussion»	1-9
A	LAPUENTE D. et al. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. VACCINE. 2018, Vol.36, No.19, p.1-9 doi: 10.1016/j.vaccine.2018.02.075 с.1-2, раздел «Introduction», с.2, раздел «Adenoviral vectors and DNA vaccines», с.3-6, раздел «Results»	1-9
A	RU 2751485 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ) 2021-07-14 реферат, формула, примеры	1-9
A	EP 3950947 A1 (ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCE PLA et al.) 2022-02-09 реферат, примеры 1-4	1-9
A	THIRION C. et al. Adenovirus vectors based on human adenovirus type 19a have high potential for human muscle-directed gene therapy. HUM GENE THER. 2006, Vol.17, No.2, p.193-205 doi: 10.1089/hum.2006.17.193 весь документ	1-9

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

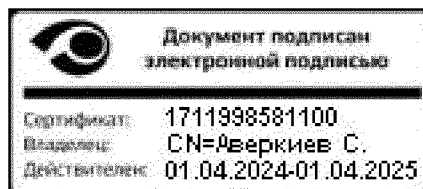
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 17 сентября 2024 (17.09.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202300043

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C12N 15/861 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)

СПК:

C12N 15/861
A61K 39/145
A61K 39/215
C12N 2330/30
C12N 2710/10041
A61K 2039/525
A61K 2039/575

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202300043

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
А	ПШАРОВ М.М. и др. Рекомбинантные аденовирусы человека как платформа для создания новых эффективных и безопасных вакцин. ПЕДИАТРИЯ. 2020, Т.99, №6, с.52-56 doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-52-56 весь документ	1-9