

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390477** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.09

(22) Дата подачи заявки
2021.08.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/125* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(54) **ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ AAV5 ПРОТИВ SARS-CoV-2**

(31) **2020128658**

(32) **2020.08.28**

(33) **RU**

(86) **PCT/RU2021/050279**

(87) **WO 2022/045935 2022.03.03**

(71) Заявитель:
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Прокофьев Александр Владимирович,
Гершович Павел Михайлович,
Стрелкова Анна Николаевна,
Спирина Наталья Александровна,
Кондинская Диана Александровна,
Яковлев Павел Андреевич, Морозов
Дмитрий Валентинович (RU)**

(74) Представитель:

Мельчаева О.А. (RU)

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, иммунологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром), нуклеиновой кислоте, которая кодирует RBD-S вируса SARS-CoV-2, экспрессионной кассете и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, вакцине на основе AAV5 для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и их применению для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

A1

202390477

202390477

A1

ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ AAV5 ПРОТИВ SARS-COV-2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области биотехнологии, иммунологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром), нуклеиновой кислоте, которая кодирует RBD-S вируса SARS-CoV-2, экспрессионной кассете и вектору на ее основе, а также к рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, вакцине на основе AAV5 для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и их применению для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Коронавирус SARS-CoV-2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром) относится к роду Betacoronavirus, подроду Sarbecovirus.

Вирус SARS-CoV-2 обнаружен в декабре 2019 года в результате анализа образцов, взятых у пациентов с пневмонией. 31 декабря 2019 года Всемирная организация здравоохранения была оповещена о нескольких случаях вирусной пневмонии, вызванной ранее неизвестным патогеном. Впервые геном вируса был полностью расшифрованы в Китае.

Коронавирусы, к которым относится SARS-CoV-2, обычно вызывают острые респираторные заболевания. К этому же семейству относятся вирусы SARS-CoV и MERS-CoV, вызывающие тяжёлый острый респираторный синдром и ближневосточный респираторный синдром соответственно.

Коронавирусом SARS-CoV-2 обусловлена продолжающаяся пандемия COVID-19. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку эпидемии, связанной с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения международного значения, а 11 марта 2020 года охарактеризовала принявшее мировой масштаб распространение болезни как пандемию.

В БД GenBank, Wu F., Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome, 2020, GenBank: MN908947.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>) и в статье Fan Wu ET AL., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, 2020, Nature, volume 579, pages 265-269 (<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>) представлена информация о геноме SARS-CoV-2.

В патентном документе CN110951756 (B) описаны последовательности нуклеотидных кислот, кодирующие пептид антигена вируса SARS-CoV-2, и указано, что данные последовательности нуклеотидных кислот могут использоваться для индукции соответствующих реакций иммунной защиты, и ожидается, что они будут использованы в вакцинах против SARS-CoV-2.

В патентном документе CN110974950B описана вакцина для предотвращения инфекции SARS-CoV-2, где вакцина содержит

аденовирусный вектор Ad5, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептид антигена вируса SARS-CoV-2.

В патентном документе RU2720614 C1 (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России)) описана вакцина на основе рекомбинантных аденовирусных частиц 5 и/или 26 серотипа, которые содержат ген белка S вируса SARS-CoV-2.

На дату подачи данной заявки, коронавирусом SARS-CoV-2 заболело более 23 миллионов человек, более 800 тысяч человек умерли от коронавируса SARS-CoV-2. Более того, пандемия COVID-19 продолжается и на дату подачи заявки. Таким образом, существует острая общемировая потребность в эффективных средствах профилактики и лечения заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Описание изобретения

Авторами изобретения был разработан выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, который используется в качестве антигена для эффективной иммунизации млекопитающих с индукцией специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, что будет обуславливать профилактику заболеваний, вызванных вирусом SARS-CoV-2. Авторами изобретения были также разработаны средства доставки вышеуказанного антигена в организм млекопитающего, а именно, экспрессионный вектор, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеуказанный антиген, рекомбинантный вирус на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа), который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеуказанный антиген, вакцины, которые включают вышеуказанные объекты и способы их применения для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, который представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром), который представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции вызванной SARS-CoV-2, который включает капсид и любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (S2A и T711S).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (S2A и T711S).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, который включает введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5, вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, в эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5, вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в эффективном количестве.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой схему плазмиды pAAV-RBD-S, предназначенной для получения AAV вектора с экспрессионной кассетой, содержащей последовательность гена RBD-S рекомбинантного рецептор-связывающего домена гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2

Leader peptide - лидерный пептид, обеспечивающий секрецию целевого белка

RBD-S - рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

AmpR - ген бета-лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину,

pUC origin- pUC ориджин репликации в бактериях,

ITR - инвертированные терминальные повторы,

CMV-Enhancer - энхансер цитомегаловируса,

CMV-Promoter - промотор ранних генов цитомегаловируса,

Poly A - последовательность сигнала полиаденилирования, для повышения стабильности мРНК,

HBG Intron - (human beta globine intron), фрагмент гена β глобина человека, несущий интрон.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий концентрацию белка RBD-S в культурах клеток CHO-K1-S спустя 3 дня после трансдукции клеток вирусным препаратом AAV5-RBD-S.

Фигура 3,4 представляет собой график, показывающий содержание антител к белку RBD-S в плазме крови экспериментальных животных после проведения иммунизации препаратом AAV5-RBD-S (внутримышечное введение из расчета 1×10^{11} VG/мышь; объем введения - 200 мкл). Фиг.3 - индивидуальные показатели для каждого животного в исследовании. Фиг.4 - средние значения \pm стандартное отклонение (n=8). VG - viral genomes или вирусные геномы.

Фигура 5,6 представляет собой график, показывающий содержание антител к белку RBD-S в плазме крови экспериментальных животных после проведения иммунизации препаратом AAV5-RBD-S (внутримышечное введение из расчета 4×10^{11} VG/мышь; объем введения - 200 мкл). Фиг.5 - индивидуальные показатели для каждого животного в исследовании. Фиг.6 - средние значения \pm стандартное отклонение (n=8). VG - viral genomes или вирусные геномы.

Фигура 7 представляет собой график, показывающий содержание антител к белку RBD-S в плазме крови экспериментальных животных после проведения иммунизации препаратом AAV5, геном которого не содержит экспрессионную кассету с геном RBD-S (препарат с пустыми капсидами AAV5). Внутримышечное введение из расчета $8,6 \times 10^{10}$ CP/мышь; объем введения - 200 мкл). На графике приведены индивидуальные показатели для каждого животного в исследовании. CP - viral capsids или вирусные капсиды.

Фигура 8,9 представляет собой график, показывающий содержание антител к белку RBD-S в плазме крови экспериментальных животных после проведения иммунизации препаратом очищенного рекомбинантного белка RBD-S. (внутримышечное введение из расчета 20 мкг/мышь). Фиг.8 - индивидуальные показатели для каждого животного в исследовании. Фиг.9 - средние значения \pm стандартное отклонение (n=7).

Фигура 10 представляет собой график, показывающий содержание антител к белку RBD-S в плазме крови экспериментальных животных после проведения иммунизации контрольным препаратом, не содержащим

AAV. На графике приведены индивидуальные показатели для каждого животного в исследовании.

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

«Выделенный» означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природе присутствующие в животном, не являются «выделенными», но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать, по существу, в очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, генетически модифицированной клетке.

Определения «встречающийся в природе», «нативный» или «дикого типа» используют для описания объекта, который можно обнаружить в природе как отличающийся от получаемого искусственно. Например, белок или нуклеотидная последовательность, присутствующие в организме (включая вирус), которые можно изолировать из источника в природе, и которые не модифицированы умышленно специалистом в лаборатории, являются встречающимися в природе.

Термин «геном» относится к полному генетическому материалу организма.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Белок (Пептид)

В настоящем описании термины «пептид», «полипептид» и «белок» используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует ограничений по максимальному количеству аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как применяют в настоящем описании, термин относится и к коротким цепям, также общепринято обозначаемым в этой области, например, как

пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, как правило, обозначаемым в этой области как белки, множество типов которых существует. «Полипептиды» включают, помимо прочего, например, биологически активные фрагменты, по существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

Молекулы нуклеиновых кислот

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Специалист в этой области имеет общие знания о том, что нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, которые можно гидролизовать до мономерных «нуклеотидов». Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать в нуклеозиды. Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Термины «трансформация», «трансфекция», «трансдукция» относятся к любому способу или средствам, с помощью которых нуклеиновая кислота вводится в клетку или организм-хозяин, и могут быть использованы взаимозаменяемо для передачи аналогичного значения. Такие способы включают в себя без ограничения трансфекцию, электропорацию, микроинъекции, инфицирование, ПЭГ-сплавление и тому подобное.

Аденоассоциированный вирус (AAV)

Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-содержащие вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, представители которого инфицируют позвоночных животных, и Densovirinae, представители которого инфицируют насекомых. К 2006 году были описаны 11 серотипов аденоассоциированного вируса (Mori, S. ET AL., 2004, «Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein», *Virology*, Т. 330 (2): 375-83). Все известные серотипы могут инфицировать клетки многих видов тканей. Тканевая специфичность определяется серотипом белков капсида, поэтому векторы на основе аденоассоциированного вируса конструируют, задавая необходимый серотип. Дополнительная информация по парвовирусам и другим представителям Parvoviridae описана в литературе (Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication», Chapter 69 in *Fields Virology* (3d Ed. 1996)).

Геномная организация всех известных серотипов AAV очень сходна. Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая содержит менее чем примерно 5000 нуклеотидов (нт) в длину. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности репликации неструктурных белков (Rep) и структурных белков (Cap). Ген Cap кодирует белки VP (VP1, VP2 и VP3), которые образуют капсид. Концевые 145 нуклеотидов являются самокомплементарными и организованы таким образом, что может быть сформирован энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильчатую структуру. Такие шпильчатые структуры функционируют как точки начала репликации ДНК вируса, являясь праймерами для клеточного ДНК-полимеразного комплекса. После инфекции клеток млекопитающих AAV дикого типа (wtAAV) гены Rep (например, Rep78 и Rep52) экспрессируются с помощью P5 промотора и P19 промотора, соответственно, и оба белка Rep выполняют определенную функцию в репликации генома вируса. Сплайсинг в открытой рамке считывания Rep (Rep ORF) приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (например, Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, является достаточной для продукции вектора AAV в клетках млекопитающих.

Вектор

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена.

Термины «инфекционная единица» (ие), «инфекционная частица» или «репликационная единица», как используется в отношении вирусного титра, относятся к числу инфекционных частиц рекомбинантного вектора AAV, которое измеряют посредством анализа инфекционных центров, также известного как анализ репликационных центров, описанный, например, в публикации McLaughlin et al., *J. Virol.* (1988) 62:1963-1973.

Термин «гетерологичный», когда он относится к последовательностям нуклеиновых кислот, таким как кодирующие последовательности и последовательности регуляции, обозначает последовательности, которые обычно не соединены вместе и/или обычно не связаны с конкретной клеткой. Таким образом, «гетерологичная»

область конструкции нуклеиновой кислоты или вектора представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, расположенный внутри или присоединенный к другой молекуле нуклеиновой кислоты, которая в природе не найдена совместно с другой молекулой. Например, гетерологичная область конструкции нуклеиновой кислоты может содержать кодирующую последовательность, фланкированную последовательностями, которые в природе не найдены совместно с кодирующей последовательностью. Другой пример гетерологичной кодирующей последовательности представляет собой конструкцию, где сама кодирующая последовательность не найдена в природе (например, синтетические последовательности, которые содержат кодоны, отличные от нативного гена).

Как применяют в настоящем описании, термин «экспрессия» определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

Применение

Термин «профилактика» или «предупреждение» и подобные им означает замедление или предотвращение появления симптомов заболевания, расстройства или инфекции.

Термин «индукция иммунного ответа» как используют в настоящем изобретении, относится к специфическому контролю или к влиянию на активность иммунного ответа и включает активацию иммунного ответа, стимуляцию иммунного ответа, усиление иммунного ответа.

Термин «специфический иммунитет» как используют в настоящем изобретении, относится к состоянию невосприимчивости к заболеванию в следствие индукции иммунного ответа.

Термин «нарушение» означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к возникновению данного нарушения.

«Заболевание» является состоянием здоровья животного, где животное не может поддерживать гомеостаз, и где, если заболевание не облегчают, то здоровье животного продолжает ухудшаться.

Термин «субъект», «пациент», «индивидуум» и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, поддающимся воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления субъект, пациент или индивидуум является человеком. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

«Терапевтически эффективным количеством» или «эффективным количеством» считается количество вводимого терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится профилактика.

Подробное описание изобретения

Пептидный антиген

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному рецептор-связывающему домену гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 (коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром), который представлен аминокислотной последовательностью

```
RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYG
VSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
NYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV
VLSFEL LHPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVR
DPQTLEILDITPSSFGGVS (SEQ ID NO:1).
```

Данный RBD-S вируса SARS-CoV-2 был получен из полноразмерного гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, который описан в БД GenBank, Wu F., Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome, 2020, GenBank: MN908947.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>) и в статье Fan Wu ET AL., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, 2020, Nature, volume 579, pages 265-269 (<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>) и имеет следующую аминокислотную последовательность:

```
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVT
WFHAIHVSNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWI FGTTLDSTQSLNINNATNVVIKVC
EFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRE FVFKNIDG
YFKIYSKHTPINLVRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYV
GYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNL
CPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIR
GDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTE
IQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHPATVCGPKKSTNLVKNKCV
NFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQ
VAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQ
TQTNPRRARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYIC
GDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSK
PSKRSEFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLA
GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN
VLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS
RLDKVEAEVQIDRLITGRQLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM
SFPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF TAPAICHGKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTD
NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRL
NEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCC
KFDEDDSEPVKGVKLYHT (SEQ ID NO:6).
```

Из вышеуказанной последовательности гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 был выбран на основе анализа структуры данного гликопротеина (См. пример 1) рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, который имеет следующую аминокислотную последовательность

```
RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYG
VSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
NYLYRFLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV
VLSFEL LHPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVR
DPQTLEILDITPCSFGGVS (SEQ ID NO:7).
```

Далее в аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:7 была внесена точечная аминокислотная замена C272S для обеспечения дополнительной стабильности белка RBD-S вируса SARS-CoV-2 и, таким образом, был получен рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Нуклеиновая кислота

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты нуклеазы. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия нуклеазы, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотидную последовательность

```
AGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCCSTAATATTACAAACTTGTGCCSTTTTGGT
GAAGTTTTTAAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGT
TGCTGATTATTCTGTCCSTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAAGTGTATGGAGTGTCTCSTA
СТАААТТАААТГАТСТСТГСТТТАСТААТГТСТАТГСАГАТТСАТТТГТААТТАГАГГТГАТГААГТС
AGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTAC
AGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGT
ATAGATTGTTTAGGAAGTСТААТСТСАААСТТТТГАГАГАГАТАТТТСААСТГАААТСТАТСАГГСС
GGTAGCACACSTTGTAAATGGTGTGAAAGTTTTAATTGTTACTTTTCCSTTTACAATCATATGGTTTCCA
ACCCASTAATGGTGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCAC
CAGCAACTGTTTGTGGACСТАААААГТСТАСТААТТТГГТТАААААСАААТГТГТСААТТТСААСТТС
ААТГГТТТАААСАГГСААГГТТТТААТГТГТСТААААААГТТТТСТГССТТТССААААТТТГГ
CAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATTCTTGACATTACAC
CATCTTCTTTTGGTGGTGTCAAGT (SEQ ID NO: 2).
```

В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.

Экспрессионная кассета. Экспрессионный вектор.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, которая включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2.

Термин «экспрессионная кассета» при использовании в данном документе, в частности, относится к фрагменту ДНК, который способен в соответствующей обстановке запускать экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, который включен в указанную экспрессионную кассету. При введении в клетку-хозяина экспрессионная кассета помимо прочего способна задействовать клеточные механизмы для транскрипции полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид, в РНК, которая затем обычно дополнительно процессируется и, наконец, транслируется в

представляющий интерес полипептид. Экспрессионная кассета может содержаться в экспрессионном векторе.

Экспрессионная кассета по настоящему изобретению содержит в качестве элемента промотор. Термин «промотор», используемый в настоящем документе, в частности, относится к элементу ДНК, который способствует транскрипции полинуклеотида, с которым функционально связан промотор. Промотор может также составлять часть элемента «промотор/энхансер». Хотя физические границы между элементами «промотор» и «энхансер» не всегда ясны, термин «промотор» обычно относится к месту на молекуле нуклеиновой кислоты, с которым связывается РНК-полимераза и/или связанные с ней факторы, и с которого иницируется транскрипция. Энхансеры усиливают активность промотора во времени, а также пространственно. В данной области известно множество промоторов, которые транскрипционно активны в широком диапазоне типов клеток. Промоторы могут быть разделены на два класса: на тех, которые функционируют конститутивно, и тех, которые регулируются индукцией или снятием репрессии. Для экспрессии белка пригодны оба класса. Промоторы, которые используются для продукции высокого уровня полипептидов в эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающих, должны быть сильными и, предпочтительно, должны быть активными в широком диапазоне типов клеток. Сильные конститутивные промоторы, которые способны запускать экспрессию во многих типах клеток, хорошо известны в данной области и, поэтому, нет необходимости в их подробном описании в данном документе. В соответствии с идеей настоящего изобретения предпочтительно использовать промотор цитомегаловируса (CMV). Промотор или промотор/энхансер, полученные из немедленной ранней (IE) области цитомегаловируса (hCMV) человека, в особенности подходят в качестве промотора в экспрессионной кассете по настоящему изобретению. Немедленная ранняя (IE) область цитомегаловируса (hCMV) человека и полученные из нее функциональные запускающие экспрессию фрагменты и/или функциональные усиливающие экспрессию фрагменты, например, описаны в EP0173177 и EP0323997, а также хорошо известны в данной области. Таким образом, несколько фрагментов немедленной ранней (IE) области hCMV могут использоваться в качестве промотора и/или промотора/энхансера. Согласно одному варианту осуществления изобретения промотор CMV человека используется в экспрессионной кассете по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотор;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы) имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

Cctgcaggcagctgсgсgctсgctсgctсactgaggccgcccgggсgtсgggсgacctttggтсgcccggcctсagtгagсgagсgagсgсgсagagaggгagtggссаactсcatсactaggggttcct (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах CMV (цитомегаловирусный) энхансер имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

сgttacataacttacggтааатggcccсgctggctгaccгсссаасгacccccгсссattгacгtсаатаатгacгtatgttcccатagтаасгCcaataggгactttccattгacгtcaatgggтggagtattacggтааactгсссacttggсagтacatcaagtгtatcatatгссаagtacгсссctattгacгtcaatгacggтааатggcccсgctggcattatгсссagтacatгaccttatgggactttcctacttгсagтacatctacгtattagтcatсgctattaccatг (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах CMV (цитомегаловирусный) промотор имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

gtgatгсggttttggсagтacatcaatgggсgtggatagсggtttgactсacggggatttссaagtctccacccccattгacгtcaatgggagtttgttttgGcaccсаааатсаacgggactttccсаааатгtсgтаасаactccгсссattгacгсааатggгсgгtagгсgtгtacggтgggaggtctatataagсaгagct (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1) имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

сгаатccccggссгггаасгgtгcatttггаасгсггattccccгtgссaagagtгacгтаагтассгсctatagagtctataggсссасаааааатгctttcttctttтаатаactttttgtttatcttatcttaataactttccctaactctctttctttcaggгсаатаатгатаcaatгtatcatгсctctttгсacattctaaagaataacagtгатаaattctgggtтаaggсаатagcaatatttctгсататааатattctгсататааатtгтаactгatгтаagaggtttcatattгctaatagсagctacaatccagctacca ttctгcttttattttatgggtgggатаaggctggattattctгagtccaagctaggсссcttttгctaаtcatgttcатacctcttatcttctccсacagctcctgggсаасгtgctggтctgtgtгctggсссатсactttggсаагаattgggat (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека) имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

Acgggtggсatccctgtгaccсctccccagтгсctctcctggсссctgгаagttгссactccagтгсссaccagсcttgtcctaataаааттаagttгсатcattttgtctгactaggtгtccttctataatattatggggtggagggggggtggтatggagсаaggggcaagttgggaagacaacctгtagggсctгсgggtctattgggaaccaagctggagtгсagтggсасаатcttggctсactгсаатctccгсctcctgggttcaagсgattctcctгсctсagсctcccгagttgttgggattccaggсatгсатгaccaggtсagстаатttttgttttttggtagagacggggtttcaccатattggссaggctggтctccaactсctaatctcaggtгatctaccсaccttggсctccсааатtгctgggattacaggсgtгаaccactгctссcttccctгtcctt (SEQ ID NO: 12).

В некоторых вариантах правый (второй) ITR имеет следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

aggaaccсctagtгatggagtтggссactссctctctгсgсgctсgctсgctсactгaggгссгггсгассааaggтсгсссгacгсссgggctttгсссggгсгсctсagtгagсgagсgagсгсгсagсtgсctгсagg (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с нуклеотидной последовательностью:

сctгсagгсagctгсgсgctсgctсgctсactгaggгссгсссgggсgtсgggсgacctttggтсgcccggcctсagtгagсgagсgagсгсгсagagaggгagtggссаactсcatсactaggggttcctгсggссгсacгсgtctagttattaatagтаатcaattacggggtcattagttcatagccсататatggagtтccгсgttacataacttacggтааатggcccсgctggctгaccгсссаacгacccccгсссattгасgtcaатаатгacгtatgttcccатagтаасгCcaataggгactttccattгacгtcaatgggтggagtatttacggтааactгсссacttggсagтacatcaagtгtatcatatгссaagtacгсссctattгасgtcaatгacggтааатggcccсgctggcattatгсссagтacatгaccttatgggactttcctacttggсagтacatctacгtattagтcatсgctattaccatggтgatгсggtttttggсagтacatcaatggгсgtggatagсggtttgactсacggggatttccaagtctccacccccattгacгtcaatgggagtтgtttgGcaccсаааатсаacgggactttccсаааатgtсgтаасаactccгсссattгacгсааатggгсg

gtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccggtcagatcgcttgagaga
cgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggttcgaatc
ccggccgggaacgggtgcattggaacgcggttccccgtgccaagagtgcgtaagtaccgctataga
gtctataggcccacaaaaaatgctttcttcttttaataacttttttgttatcttatttctaataact
ttccctaactcttttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaag
aataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataa
attgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttta
ttttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcata
cctcttatcttccctcccacagctcctgggcaacgtgctgggtctgtgtgctggcccatcactttggcaa
agaattgggattcgaacatcgCGATAaattaGCCGCCACCATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGT
GCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGGTCGACCGGGAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCCCTA
ATATTACAAACTTGTGCCCTTTGGTGAAGTTTTAAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGG
AACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAAATCCGCATCATTTTCCAC
TTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGATT
CATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTAT
AATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATCTTGATTCTAA
GGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTGAGAGAG
ATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTTAC
TTTCSTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGT
ACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
AAAACAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTTAAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAA
AAGTTTCTGCSTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACA
GACACTTGAGATTCTTGACATTACCCATCTTCTTTTGGTGGTGTGAGTtaaGgatcctctagagtcg
acctgcagaagcttgccctcgagcagcgtgctcgagagatctacgggtggcatccctgtgaccctcc
ccagtgccctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgcctaataaaaattaag
ttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatgggggtggaggggggtggatggagca
aggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtg
gcacaatcttggtcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccga
gttggtgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaattttgttttttggtagagacgggggtt
tcaccatattggccaggctgggtctccaactcctaattctcaggtgatctaccaccttggcctccc
ttgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtg
cggaccgagcggccgaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgctgctcgtcgtcgt
cactgaggccgggacccaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggctcctcagtgagcgcgagc
gagcgcgagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 3).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, или любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как

«рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы» («вектор экспрессии» или «экспрессионный вектор»)).

Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать лидерный пептид (или сигнальный пептид), который облегчает выработку белка-интереса клеткой-хозяином. Ген белка-интереса может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца белка-интереса. Лидерным пептидом (или сигнальным пептидом) может быть лидерный пептид иммуноглобулина или гетерологичный лидерный пептид (то есть, лидерный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо гена RBD-S вируса SARS-CoV-2 по данному изобретению, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию гена RBD-S вируса SARS-CoV-2 в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

В контексте настоящего описания термин «промотор» или «регуляторная последовательность транскрипции» или «регуляторная последовательность» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который контролирует транскрипцию одной или нескольких кодирующих последовательностей, и который расположен против направления считывания информации относительно направления транскрипции от сайта

инициации транскрипции кодирующей последовательности, а также который структурно идентифицируется по наличию сайта связывания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сайтов инициации транскрипции и других последовательностей ДНК, включающих, без ограничения, сайты связывания фактора транскрипции, сайты связывания репрессора и активатора белка, а также любые другие последовательности нуклеотидов, известные специалистам в данной области, которые непосредственно или опосредованно регулируют уровень транскрипции с данным промотором. «Конститутивный» промотор представляет собой такой промотор, который активен в большинстве тканей в обычных физиологических условиях и условиях развития. «Индукцибельный» промотор представляет собой промотор, который подвергается физиологической регуляции или регуляции в ходе развития, например, при воздействии химического индуктора. «Тканеспецифичный» промотор активен только в конкретных типах тканей или клеток.

Термины «энхансеры» или «энхансер», используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт. Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой последовательности. Энхансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество энхансерных элементов.

В дополнение к вышеуказанным генам и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селективируемого маркера. Ген селективируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селективируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селективируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах при селекции/амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтетазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК;

последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

В контексте настоящего описания термин «функционально связанный» относится к связи полинуклеотидных (или полипептидных) элементов в функциональную связь. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», если она находится в условиях функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, регуляторная последовательность транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если она влияет на транскрипцию указанной кодирующей последовательности. Термин «функционально связанный» означает, что связанные последовательности ДНК являются, как правило, непрерывными, и при необходимости соединения двух участков, кодирующих белок, являются также непрерывными и находятся в рамке считывания.

В одном из вариантов настоящего изобретения «экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему одну или несколько интересующих полинуклеотидных последовательностей, интересующих генов или «транстенов», которые фланкированы парвовирусными или инвертированными концевыми повторяющимися последовательностями (ITR).

Ни кассета, ни вектор по изобретению не содержит нуклеотидные последовательности генов, кодирующих неструктурные белки (Rep) и структурные белки (Cap) аденоассоциированного вируса.

Рекомбинантный вирус на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа)

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, который включает капсид и любую из вышеуказанных экспрессионных кассет.

Термин «рекомбинантный вирус на основе AAV» (или «вирусоподобная частица на основе AAV», или «рекомбинантный вирусный штамм AAV», или «рекомбинантный вектор AAV», или «вектор rAAV») в контексте настоящего описания относится к вышеуказанной экспрессионной кассете (или вышеуказанному экспрессионному вектору), которая заключена внутри капсида AAV.

Ген Cap, помимо других альтернативных продуктов, кодирует 3 капсидных белка (VP1, VP2 и VP3). Белки VP1, VP2 и VP3 находятся в соотношении 1:1:10, образуя икосаэдрический капсид (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410).

Транскрипция этих генов начинается с одного промотора, р40. Молекулярная масса соответствующих белков (VP1, VP2 и VP3) составляет 87, 72 и 62 кДа, соответственно. Все три белка транслируются с одной мРНК. После транскрипции пре-мРНК может подвергаться сплайсингу двумя разными способами, при этом вырезается более длинный или более короткий интрон и образуются мРНК различной нуклеотидной длины.

При образовании рекомбинантного вируса на основе AAV (rAAV) кассета экспрессии, фланкированная ИКП (ITR), упаковывается в капсид AAV. Гены, необходимые для репликации AAV, как было указано выше, не входят в кассету.

ДНК экспрессионной кассеты упакована в вирусный капсид в виде одноцепочечной молекулы ДНК (оцДНК) длиной приблизительно 3000 нуклеотидов. После инфицирования клетки вирусом, одноцепочечную ДНК конвертируют в форму двухцепочечной ДНК (дцДНК). Только дцДНК могут использовать белки клетки, которые транскрибируют содержащийся ген или гены в РНК.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность

```
MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLPGNGLDRGEPVNRAD
EVARENDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEFQEKLADDTSTFGGNL GKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAK
TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDN
NQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTP WGY
FDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQ
LPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKMLRTGNNF EFTYNF
EEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWN
LGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLE
GNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I WAKIP
ETGANFHPSAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENS
KRWNPEIQYTNNYNDRQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 4).
```

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDN
NQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTP WGY
FDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQ
LPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKMLRTGNNF EFTYNF
EEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWN
LGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLE
GNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I WAKIP
ETGANFHPSAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENS
KRWNPEIQYTNNYNDRQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 14).
```

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий следующую аминокислотную последовательность

```
MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDGSNA
NAYFGYSTP WGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLT
STVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKML
```

RTGNNFEFTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGR TQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTT ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I WAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVT VEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 15).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1, VP2 и VP3 AAV5.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 4, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 14 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные замены в положениях S2A и T711S VP1 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 4), и имеет аминокислотную последовательность

MAFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNGNLD RGEF VNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADA EFQEKLADDT SFGGNL GKAVFQAKKR VLEPFGLV EEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGG PLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDG SNANAYFGYS TPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFT DDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKMLRTGN NFE FTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGR TQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTT ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I WAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVT VEMEWEL KKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP2 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные замены в положении T575S VP2 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 14), и имеет аминокислотную последовательность

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGG PLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHQYREIKSGSVDG SNANAYFGYS TPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFT DDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKMLRTGN NFE FTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGR TQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTT ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGP I WAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVT VEMEWEL KKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP3 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность, которая включает аминокислотные замены в положении T519S VP3 AAV5 дикого типа (SEQ ID NO: 15), и имеет аминокислотную последовательность

MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTRTWVLPSSYNNHQYREIKSGSV
DGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTI
ANLNTSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFCCLEYF
PSKMLRTGNNFEFTYNFEEVFPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYAN
TYKNWFPGPMGRTOGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTM
IFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIIVPGSV
WMERDVYLGPIWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPMMMLIKNTVPVGNITSFSDVPVSSFITQYS
TGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ
ID NO: 17).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 с одной или несколькими точечными мутациями.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

Под «несколькими точечными мутациями» подразумеваются две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять точечных замен.

Особенно предпочтительные варианты включают замены (мутации), которые являются консервативными по природе, т.е. те замены, которые имеют место в семействе аминокислот, которые объединены по их боковым цепям. В частности, аминокислоты обычно делят на четыре семейства: (1) кислые – аспартат и глутамат; (2) основные – лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные – аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные – глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, достаточно обосновано предсказание о том, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или схожая консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не окажет важного влияния на биологическую активность. Например, полипептид, представляющий интерес, может включать вплоть до приблизительно 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен, при условии, что желаемая функция молекулы остается незатронутой.

Вариант точечных мутаций в последовательностях белков VP1, VP2 или VP3 AAV5 с помощью аминокислотных замен представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в белке VP1, VP2 или VP3 AAV5 на другой аминокислотный остаток.

Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены».

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены

Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, VP2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и VP3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

CMV энхансер;

CMV промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);
любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;
сигнал полиаденилирования hGH1;
правый ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 14 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 15 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

CMV энхансер;

CMV промотер;

интрон гена hBG1;

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1;

правый ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 5, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 16 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 17, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

CMV энхансер;

CMV промотер;

интрон гена hBG1;

любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2;

сигнал полиаденилирования hGH1;

правый ITR.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (S2A и T711S).

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 4, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 14 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 15, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной

последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 14 с одной или несколькими точечными мутациями и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 15 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах рекомбинантный вирус на основе AAV5 имеет капсид, который включает белки VP1 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 5, VP2 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 16 и VP3 с аминокислотной последовательность SEQ ID NO: 17, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

Фармацевтическая композиция/вакцина

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению в фармацевтически приемлемом носителе или в других фармацевтических агентах, адъювантах, разбавителях и т.д. Носитель для инъекций обычно является жидким. Носитель для других способов введения может быть или твердым, или жидким, таким как стерильная апиrogenная вода или стерильный апиrogenный фосфатно-солевой буферный раствор. Для введения путем ингаляции носитель является вдыхаемым и предпочтительно находится в твердой или жидкой дисперсной форме. В качестве инъекционной среды предпочтительно использовать воду, содержащую добавки, общепринятые для инъекционных растворов, такие как стабилизирующие агенты, соли или солевые растворы и/или буферы.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксципиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солибутилизаторы.

«Фармацевтически приемлемым» считается материал, который не имеет биологических или других противопоказаний, например, материал

можно вводить субъекту без каких-либо нежелательных биологических эффектов. Таким образом, такие фармацевтические композиции можно использовать, например, для трансфекции клетки *ex vivo* или для введения *in vivo* рекомбинантного вируса на основе AAV5 по изобретению непосредственно субъекту.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату вектора на основе rAAV5, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8 °C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «единичная стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 в эффективном количестве.

Термин «вакцина» относится к иммуногенной композиции, включающей антиген, полученный от патогена, который используется для индуцирования иммунного ответа против патогена, который обеспечивает защитный иммунитет (например, иммунитет, который защищает субъекта от инфекции, вызываемой патогеном, и/или ослабляет тяжесть заболевания или состояния, вызываемого инфекцией вследствие

патогена). Защитный иммунитет может включать формирование антител и/или клеточно-опосредованный ответ.

В зависимости от контекста термин «вакцина» может также относиться к суспензии или раствору антигена, который вводят позвоночному для выработки защитного иммунитета.

Вакцина включает рекомбинантный вирус на основе AAV5, который содержится предпочтительно в биологически эффективном количестве. «Биологически эффективное» количество рекомбинантного вируса представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать инфекцию (или трансдукцию) и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке. Если вирус вводят в клетку *in vivo* (например, вирус вводят субъекту, как описано ниже), «биологически эффективное» количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать трансдукцию и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени.

Все определения и пояснения, относящиеся к фармацевтической композиции, также относятся и к вакцине.

Применение

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5 или вышеуказанной фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, который включает введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5, вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, в эффективном количестве.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе AAV5, вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в эффективном количестве.

Любой способ введения рекомбинантного вируса на основе AAV5, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по данному изобретению.

Примеры способов введения включают в себя местное применение, интраназальное, ингаляционное, чрезслизистое, трансдермальное, энтеральное (например, пероральное, ректальное), парентеральное (например, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутримышечное) введения, а также инъекции непосредственно в ткань или в орган.

Инъекционные препараты могут быть приготовлены в общепринятых лекарственных формах: в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для приготовления растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Альтернативно, можно вводить вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 по данному

изобретению локально, а не системно, например, в виде депо или в композиции с замедленным высвобождением.

Рекомбинантный вирус на основе AAV5 вводят в организм в эффективном количестве. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 предпочтительно вводят в организм в биологически эффективном количестве. «Биологически эффективное» количество рекомбинантного вируса представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать инфекцию (или трансдукцию) и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке. Если вирус вводят в клетку *in vivo* (например, вирус вводят субъекту, как описано ниже), «биологически эффективное» количество вирусного вектора представляет собой количество, которое достаточно, чтобы вызвать трансдукцию и экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-мишени.

Дозировки вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по данному изобретению будут зависеть от способа введения, конкретного вирусного вектора и их можно определять рутинными способами. Примерными дозами для достижения терапевтического эффекта являются вирусные титры, составляющие по меньшей мере примерно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} трансдуцирующих единиц или больше, предпочтительно приблизительно от 10^8 до 10^{13} трансдуцирующих единиц, еще более предпочтительно 10^{12} трансдуцирующих единиц.

Клетка для введения вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе AAV5 по изобретению может быть клеткой любого типа, включая в себя без ограничения, эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки кожи, дыхательных путей и кишечника), печеночные клетки, мышечные клетки, клетки селезенки, фибробласты, эндотелиальные клетки и тому подобное.

Вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе AAV5 не используется для модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно

инструкциям производителей. Вкратце, плазмидную ДНК нарабатывали для дальнейших манипуляций в клетках *E. coli*, выращиваемых под селективным давлением с антибиотиками для того, чтобы плазмиды не терялись в клеточной популяции. Плазмидную ДНК выделяли из клеток коммерческими наборами, измеряли концентрацию и использовали для клонирования с помощью обработки эндонуклеазами рестрикции или методами ПЦР-амплификации. Фрагменты ДНК лигировали между собой с помощью лигаз и трансформировали в бактериальные клетки для отбора клонов и дальнейших работ. Все полученные генетические конструкции подтверждали по паттернам рестрикции и полным секвенированием по Сэнгеру.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 1000 п. н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем ренатурации олигонуклеотидов друг на друге с последующей ПЦР-амплификацией с крайних праймеров. В результате получали смесь фрагментов, включая нужный. Фрагменты клонировали по сайтам рестрикции в промежуточные векторы, после чего последовательности ДНК субклонированных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сэнгеру. Анализ последовательностей ДНК и белков и обработку данных о последовательностях осуществляли в программе SnapGene 4.2 и выше для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Культивирование клеточных культур

В экспериментах были использованы клеточные линии HEK293 (Human Embryonic Kidney clone 293) и CHO-K1-S (Chinese Hamster Ovary Cells). Суспензионные клетки HEK293, используемые для наработки AAV, культивировались в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂, на полной питательной среде без FBS и антибиотика. Адгезионные клетки CHO-K1-S, используемые для проверки эффективности препаратов AAV, культивировались в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂, на полной питательной среде DMEM/F12 добавлением 5% FBS, антибиотика/антимикотика. Пересев клеток CHO-K1-S осуществлялся при достижении 80-90% конфлюентности. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью окраски Trypan Blue и камеры Горяева либо с помощью окраски PI и проточной цитометрии.

Определение уровня белка RBD-S и специфических антител к белку RBD-S

Оценку содержания белка RBD-S после трансдукции клеток и антител к белку RBD-S в плазме крови животных после иммунизации проводили посредством постановки твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Вкратце, лунки 96-луночного планшета

сенсibilизировали первичными антителами к белку RBD-S, после наслаивали исследуемые образцы. В случае постановки ИФА на выявление антител к белку RBD-S – сенсibilизацию планшета проводили белком RBD-S, после в лунки вносили плазму крови животных. Далее к образцам добавляли вторичные антитела к RBD-S (при анализе на сам белок) или вторичные антитела к иммуноглобулинам экспериментальных животных (при анализе на наличие антител к RBD-S), меченные биотином и конъюгат стрептавидин-HRP. После вносили раствор TMB для визуализации ферментативной реакции и стоп-раствор для остановки развития реакции.

Для определения концентрации RBD-S/антител к RBD-S в исследуемых образцах, строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора от концентрации RBD-S/ антител к RBD-S в стандартных образцах и по оптической плотности тестируемого образца находили концентрацию.

Сборка и очистка вирусных частиц рекомбинантных векторов AAV

Для сборки вирусных частиц AAV, содержащих ген RBD-S, использовали клетки-продуценты HEK293, которые трансфецировали 3-мя плазмидами:

Плазмида pAAV-RBD-S, содержащая геном AAV с кассетой для экспрессии трансгена RBD-S (Фиг.1.);

Плазмида для экспрессии гена Cap серотипа AAV5 и гена Rep серотипа AAV2. Каждый ген с помощью альтернативных рамок считывания кодирует несколько белковых продуктов;

Плазмида для экспрессии генов аденовируса Ad5, необходимых для сборки и упаковки капсидов AAV.

Через 72 часа клетки лизировали и проводили очистку и концентрирование вирусных частиц с помощью методов фильтрации, хроматографии и ультрацентрифугирования. Титр вирусных частиц определяли с помощью количественной ПЦР с праймерами и пробой, специфичными к участку рекомбинантного вирусного генома и выражали в виде количества копий вирусных геномов на 1 мл.

Трансдукция клеточных культур

Клеточную линию заранее засеивали в лунки 6-луночных планшетов с плотностью посадки 10 000 кл/см², после чего добавляли препарат с вирусными частицами при MOI 100 000 вг/кл и MOI 500 000 вг/кл, на 3 день определяли содержание белка RBD-S методом ИФА, как описано выше. Эффективность трансдукции считали, анализируя процент GFP-положительных клеток.

После трансдукции клетки линии CHO-K1-S снимали с культуральных планшетов с помощью TrypLE, отмывали в PBS и анализировали экспрессию белка как описано выше.

Все работы проводились в 3 независимых экспериментах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки.

Проведение in vivo исследования на лабораторных животных

Для экспериментов были использованы мыши линии BALB/c (самцы и самки возрастом 6-8 недель). Иммунизацию проводили однократно путем внутримышечного введения препаратов в тазовые конечности. Группе

животных отрицательного контроля вводился буферный раствор, положительного контроля – смесь белка RBD-S, полного адъюванта Фрейнда и физиологического раствора.

Отбор плазмы крови производился в день инъекции до введения препаратов, далее – на 14, 21, 27, 42 и 56 день после проведения иммунизации.

Пример 1. Выбор последовательности RBD-S вируса SARS-CoV-2

При разработке антигена RBD-S вируса SARS-CoV-2 был проведен анализ структуры 5WRG белка Spike Glycoprotein вируса SARS-CoV из статьи Gui M. ET AL., Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding, 2017, Cell Res. 27, p. 119-129. Проведенный нами анализ структуры белка Spike Glycoprotein вируса SARS-CoV показал, что для иммунизации возможно использовать как консервативный домен RBD-S, так и его удлиненную часть. На основании проведенного нами анализа было установлено, что увеличение длины рассматриваемого участка RBD-S должно способствовать стабилизации структуры белка RBD-S за счет сохранения вторичных структур, которые повышают вероятность сохранения стабильной конформации белка без стремления к расплетанию. При этом незначительное увеличение длины домена RBD-S не должно сказываться на результатах иммунизации. Вышеуказанный анализ структуры белка Spike Glycoprotein вируса SARS-CoV был экстраполирован на структуру белка Spike Glycoprotein вируса SARS-CoV-2. Кроме того, в структуру белка RBD-S вируса SARS-CoV-2 была введена замена ближайшего к домену неспаренного цистеина на серин (аминокислотная замена в положении C272S) для обеспечения дополнительной стабильности белка RBD-S вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, в качестве антигена RBD-S вируса SARS-CoV-2 была выбрана следующая аминокислотная последовательность с SEQ ID NO:1.

Данный антиген будет использован для эффективной иммунизации млекопитающих (См. Пример 5).

Пример 2. Сборка генетической конструкции, содержащей экспрессионную кассету AAV с рекомбинантным геном RBD-S.

Целевая плазида pAAV-RBD-S (Фиг. 1.), предназначенная для получения вирусных векторов AAV5 с экспрессионной кассетой, включающей ген RBD-S (SEQ ID NO:1.), была получена путем замены последовательности модифицированного зеленого флуоресцентного белка в исходной конструкции pAAV-GFP Control plasmid (VPK-402) от CellBiolab (США), с помощью рестриктазно-лигазного метода клонирования по сайтам ClaI/BamHI, на последовательность RBD-S с сигнальным пептидом, синтезированной de novo из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза, с добавлением сайтов рестрикции ClaI с 5'-конца и BamHI с 3'-конца.

Конечный вектор содержит все необходимые элементы для экспрессии гена и сборки в составе генома рекомбинантного AAV:

- 1) Терминальные повторы ITR на концах последовательности, которая инкапсулируется в вирусный капсид;
- 2) Элементы для экспрессии целевого гена (промотор, энхансер, интрон, последовательность Kozak, транскрипционный сайт полиаденилирования);
- 3) Ориджин бактериальной репликации и ген устойчивости к антибиотику для наработки плазмидной ДНК в бактериальных клетках.

Пример 3. Создание вирусных препаратов, экспрессирующих RBD-S
Целевая плазида рAAV-RBD-S (Фиг 1.) вместе с остальными плазидами, необходимыми для получения вирусных частиц рекомбинантного AAV (см. выше), были использованы для наработки препарата AAV5-RBD-S. В результате биопроцесса были получены рекомбинантные вирусные частицы AAV5-RBD-S, содержащие экспрессионную кассету с геном RBD-S. Очищенный препарат AAV5-RBD-S, используемый для проведения *in vitro* и *in vivo* исследований был подготовлен с применением стандартным буферов и эксципиентов, которые являются безопасными и не изменяют свойств AAV. Концентрация очищенного препарата AAV5-RBD-S составляла $4,6 \times 10^{11}$ и $1,8 \times 10^{12}$ VG/mL.

Пример 4. Проверка работоспособности препарата AAV5-RBD-S *in vitro*

Перед проведением исследований на животных очищенный препарат AAV5-RBD-S был протестирован *in vitro*. Данные эксперименты были проведены с использованием адгезионной клеточной линии CHO-K1-S (Фиг 2.). В лунки 6-луночных планшетов были посеяны клетки линии CHO-K1-S. Посев проводили в ростовую среду: ДМЕМ/F12 с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л, 5% сыворотки эмбриональной телячьей (FBS).

Плотность посадки клеток составила 10 000 клеток/см². При постановке трансдукции подготовленные заранее клетки были трансдуцированы при MOI 100 000 вг/клетка и MOI 500 000 вг/клетка. Все образцы были поставлены в трипликатах. Для негативного контроля были использованы интактные клетки. После успешной трансдукции клетки линии CHO-K1-S снимали с подложки, отмывали в фосфатном буфере и анализировали экспрессию белка RBD-S методом иммуноферментного анализа (ИФА), как описано выше. Было показано, что разработанный нами препарат позволяет эффективно доставить трансген RBD-S в клетки и обеспечить продукцию целевого белка, что подтверждается данными проведенного ИФА анализа (Фиг 2.).

Пример 5. Проверка работоспособности препарата AAV5-RBD-S *in vivo*

Для проведения *in vivo* исследований препарата AAV5-RBD-S были использованы лабораторные мыши линии BALB/c. В исследовании использовали две различные дозы препарата AAV5-RBD-S: низкую (1×10^{11} VG/мышь) и высокую (4×10^{11} VG/мышь). В качестве негативного контроля были использованы контрольный раствор без AAV и препарат AAV5, не содержащий экспрессионную кассету с геном RBD-S (пустые капсиды AAV5). В качестве положительного контроля использовали очищенный рекомбинантный белок RBD-S. Иммунизацию животных проводили однократно посредством внутримышечных инъекций в тазовые конечности. После проведения иммунизации через 0, 14, 21, 27, 42 и 56 дней определяли титр антител к белку RBD-S в плазме крови методом ИФА, как описано выше. В результате проведенных *in vivo* исследований было показано, что иммунизация препаратами AAV5-RBD-S приводит к выработке специфических антител к RBD-S (Фиг. 3, 4, 5 и 6). При этом уровень антител к RBD-S был сопоставим с уровнем антител в группе животных, иммунизированных рекомбинантным белком RBD-S (Фиг. 8 и 9). В тоже время, не наблюдалась выработка антител к RBD-S в группах животных, которым вводили контрольный раствор без AAV и препарат

AAV5, не содержащий экспрессионную кассету с геном RBD-S (пустые капсиды AAV5) (Фиг. 7, 10).

Таким образом, рекомбинантный вирус на основе AAV5 по изобретению и вакцина на его основе обладают высоким потенциалом для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и могут использоваться для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Кроме того, они имеют преимущество перед классическими системами на основе рекомбинантных белковых антигенов т. к. вектор AAV способен обеспечить долговременную многолетнюю экспрессию антигена.

Формула изобретения

1. Выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2, который представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

2. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует выделенный рекомбинантный рецептор-связывающий домен гликопротеина S (RBD-S) вируса SARS-CoV-2 по п.1.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

4. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, которая представляет собой нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по п.2, которая представляет собой кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.

6. Экспрессионная кассета, которая включает нуклеиновую кислоту по любому из пп. 2-5.

7. Экспрессионная кассета по п.6, включающая следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);

CMV (цитомегаловирусный) энхансер;

CMV (цитомегаловирусный) промотер;

интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);

нуклеиновую кислоту по любому из пп. 2-5;

сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);

правый (второй) ITR.

8. Экспрессионная кассета по п.7, которая включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

9. Экспрессионный вектор, который включает нуклеиновую кислоту по любому из пп. 2-5 или кассету по любому пп. 6-8.

10. Выделенный рекомбинантный вирус на основе AAV5 (аденоассоциированный вирус 5 серотипа) для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 и/или профилактики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, который включает капсид и экспрессионную кассету по любому из пп. 6-8.

11. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п.10, где капсид включает белок VP1 AAV5.

12. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п.11, где капсид включает белок VP1 AAV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

13. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п.10, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями.

14. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п.13, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (S2A и T711S)

15. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп.10-13, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает следующие элементы в направлении от 5'-конца к 3'-концу:

левый (первый) ITR (инвертированные концевые повторы);
CMV (цитомегаловирусный) энхансер;
CMV (цитомегаловирусный) промотер;
интрон гена hBG1 (ген субъединицы гемоглобина гамма-1);
нуклеиновую кислоту по любому из пп. 2-5;
сигнал полиаденилирования hGH1 (сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека);
правый (второй) ITR.

16. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по п. 15, где капсид включает белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, а экспрессионная кассета включает нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 3.

17. Рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 15-16, где белок VP1 AAV5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 с одной или несколькими точечными мутациями, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (S2A и T711S).

18. Фармацевтическая композиция, включающая рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 10-17 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18 для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

20. Фармацевтическая композиция для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2.

21. Применение рекомбинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 10-17 или композиции по п. 18 для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

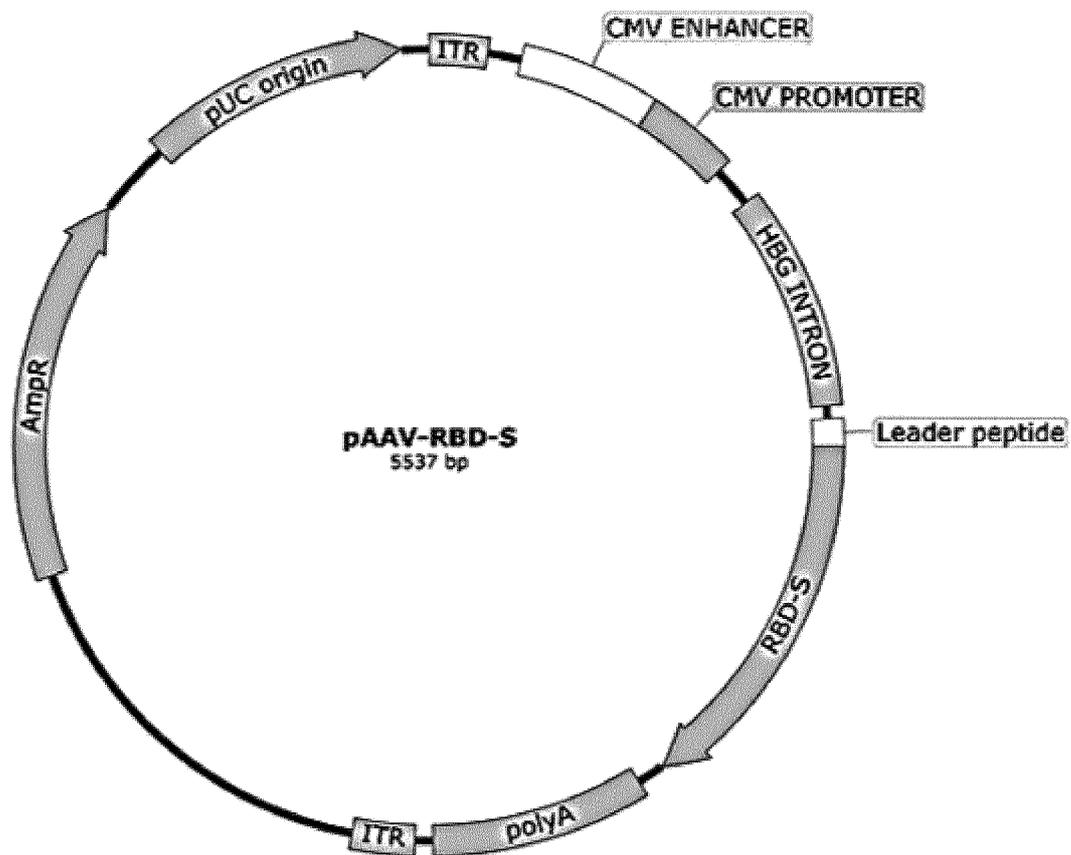
22. Применение рекомбинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 10-17 или композиции по п. 18 для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2.

23. Вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая включает рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 10-17 в эффективном количестве.

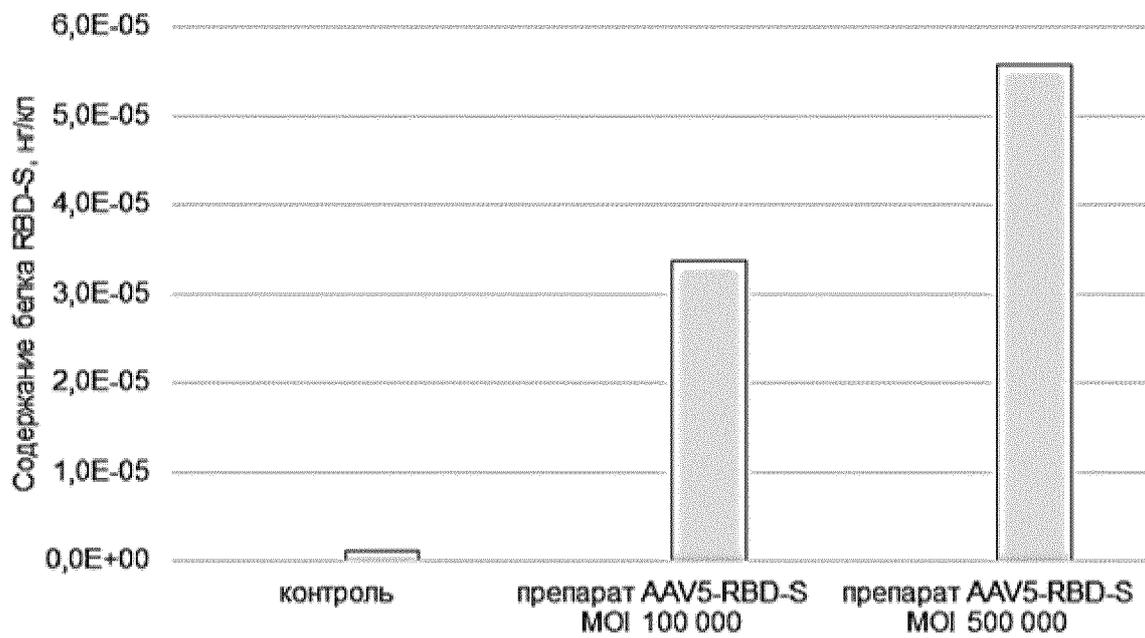
24. Вакцина для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, которая включает рекомбинантный вирус на основе AAV5 по любому из пп. 10-17 в эффективном количестве.

25. Способ индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих рекомбинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 10-17, композиции по п. 18 или вакцины по п. 24 для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, в эффективном количестве.

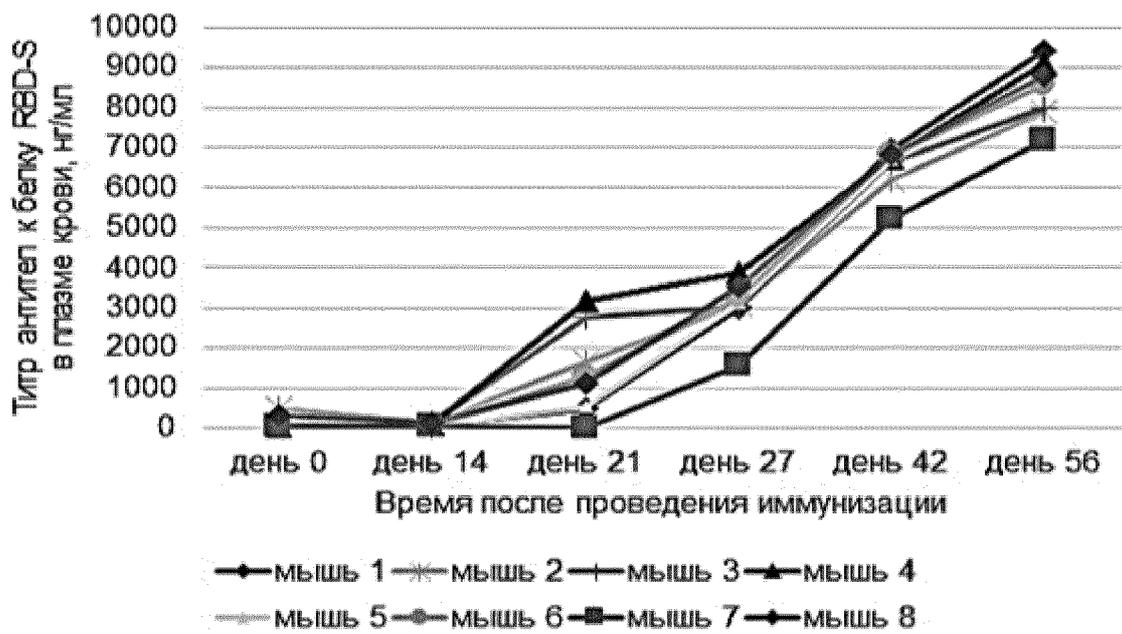
26. Способ для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, включающий введение в организм млекопитающих рекомбинантного вируса на основе AAV5 по любому из пп. 10-17, композиции по п. 18 или вакцины по п. 23 для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в эффективном количестве.



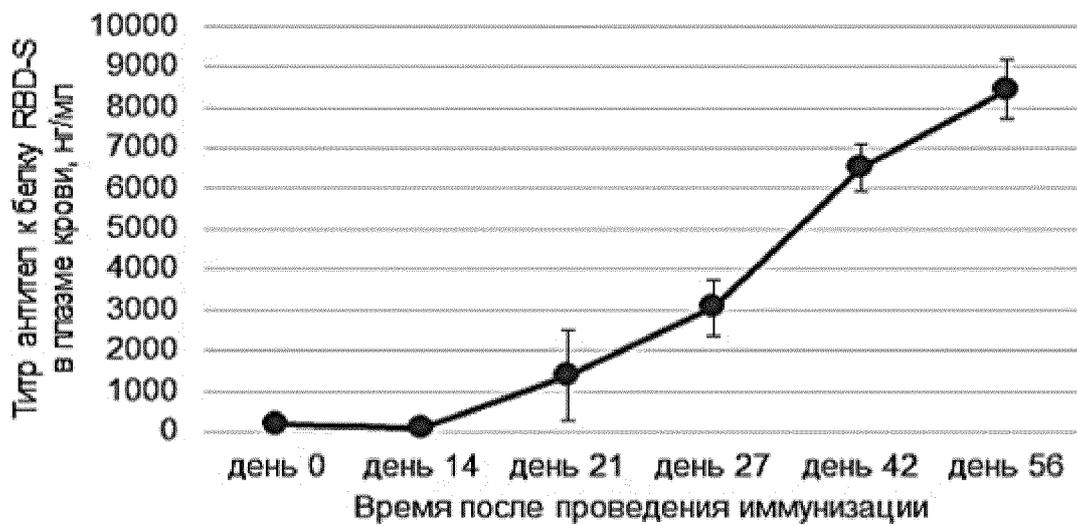
Фиг.1



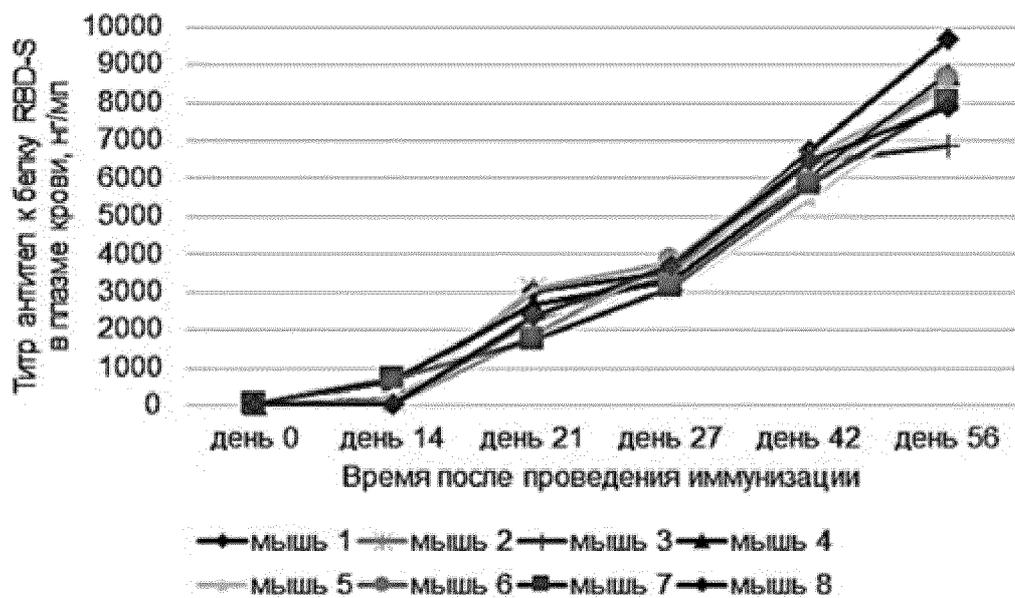
Фиг. 2



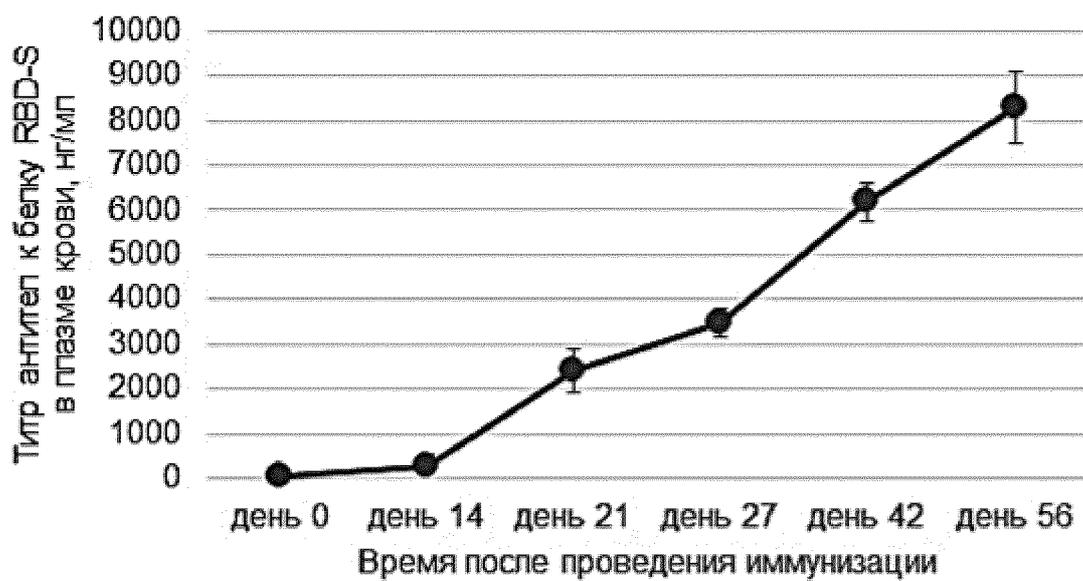
Фиг. 3



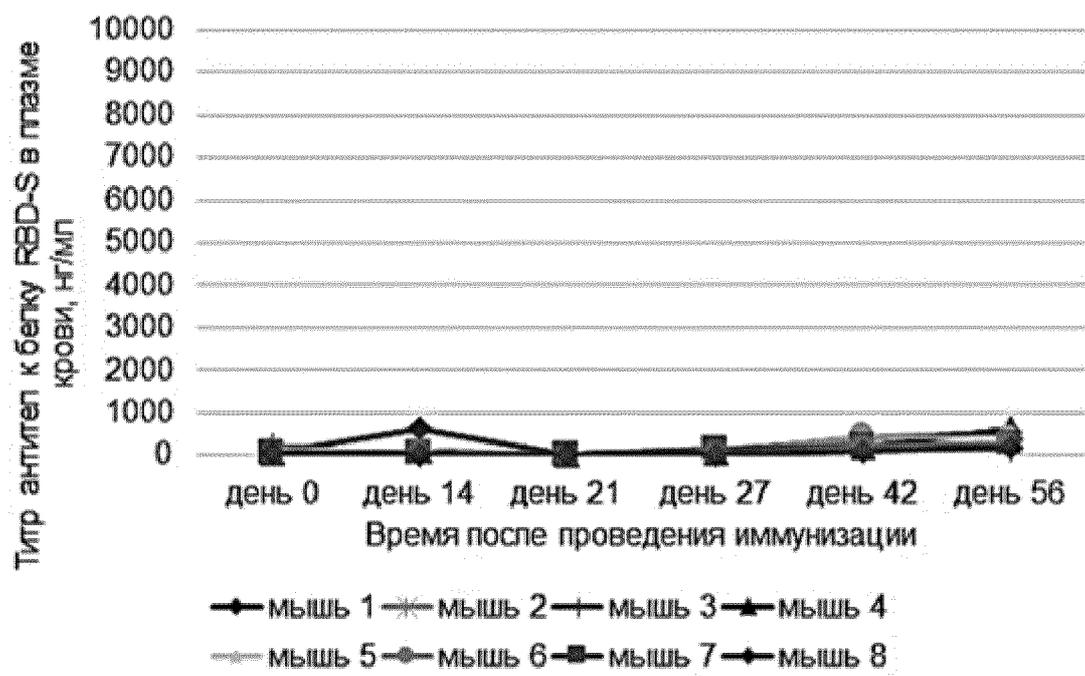
Фиг.4



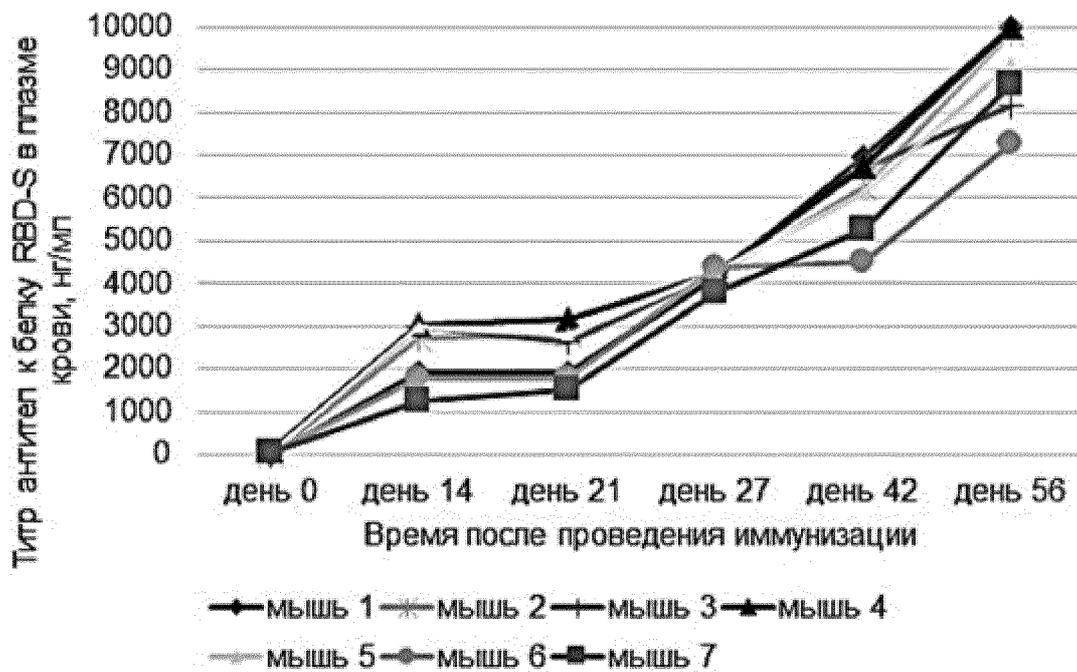
Фиг. 5



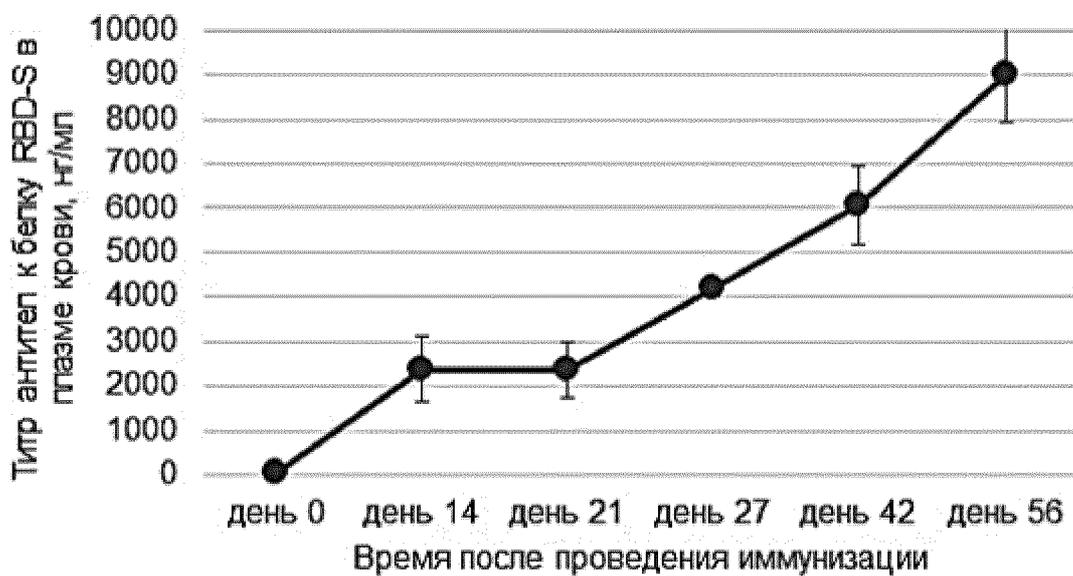
Фиг.6



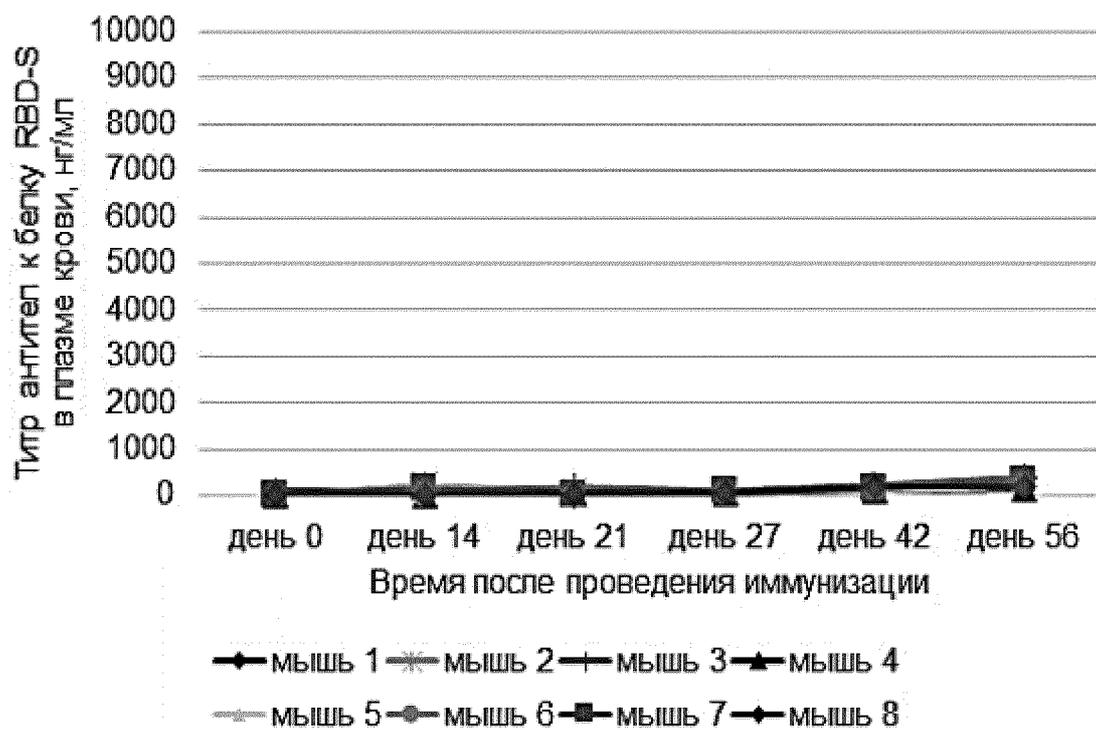
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10