

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393058 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.01(22) Дата подачи заявки  
2022.04.29(51) Int. Cl. C12N 15/117 (2010.01)  
A61K 39/39 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 31/00 (2006.01)  
A61P 37/08 (2006.01)(54) ПРИМЕНЕНИЕ ИСКУССТВЕННО СИНТЕЗИРОВАННОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО  
CPG-ДЕЗОКСИОЛИГОНУКЛЕОТИДА В ВАКЦИНАХ

(31) 202110479157.7

(32) 2021.04.30

(33) CN

(86) PCT/CN2022/090392

(87) WO 2022/228560 2022.11.03

(71) Заявитель:

ПАРР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ  
(ХЭБЭЙ) КО., ЛТД. (CN)

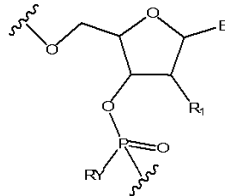
(72) Изобретатель:

Ван Лигун, Чэнь Янь, Цзэн Тин (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрытие относится к композиции, содержащей CpG ODN и один или более других адъювантов, действующих совместно с иммуномодулирующим CpG ODN, таких как алюминиевый адъювант, где CpG ODN содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-4, где по меньшей мере один нуклеотид в нуклеотидной последовательности является химически модифицированным нуклеотидом, имеющим структуру формулы (I)



где Y является S или O, R является H или положительно заряженным противоионом, B независимо представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание и R<sub>1</sub> является H, F, Cl, OH, OMe, Me, O-этилоксиметил. Настоящее изобретение также относится к применению композиции, фармацевтической композиции, содержащей композицию, способу ее получения и применению фармацевтической композиции.

A1

202393058

202393058

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579847ЕА/061

### ПРИМЕНЕНИЕ ИСКУССТВЕННО СИНТЕЗИРОВАННОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО СРG-ДЕЗОКСИОЛИГОНУКЛЕОТИДА В ВАКЦИНАХ ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее раскрытие относится к применению серии искусственно синтезированных одноцепочечных СrG-дезоксидирибонуклеотидов в вакцинах. Кроме того, настоящее раскрытие относится к применению искусственно синтезированного одноцепочечного СrG-дезоксидирибонуклеотида в качестве вакцинного адьюванта. Кроме того, настоящее раскрытие относится к применению искусственно синтезированного одноцепочечного СrG-дезоксидирибонуклеотида в генно-инженерных вакцинах, субъединичных вакцинах и инактивированных вакцинах.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вакцина представляет собой антиген, инъецируемый в кровоток для стимуляции иммунной системы для синтеза антител. Использование вакцин играет очень важную роль в контроле эпидемий заболеваний человека и животных. В соответствии с принципом получения вакцин, вакцины можно делить на инактивированные вакцины, аттенуированные вакцины, субъединичные вакцины и генно-инженерные вакцины. Генно-инженерные вакцины, в основном включают, генно-инженерные субъединичные вакцины, генно-инженерные векторные вакцины, вакцины нуклеиновых кислот, живые вакцины с deletированными генами, белковые сконструированные вакцины и т.д. Вакцины в широком смысле также включают генетические рекомбинантные вакцины, синтетические пептидные вакцины, вакцины из антиидиотипических антител и микроинкапсулированные вакцины с контролируемым замедленным высвобождением.

Термин "рекомбинантные вакцины" относится к вакцинам, получаемым с помощью механизмов генетической рекомбинации. Для решения проблем общепринятых вакцин, снижения иммуногенности, улучшения безопасности и уменьшения периода лечения используют новый способ SIT, т.е. иммунную рекомбинантную вакцину. Существует три типа: одним из них является ДНК-рекомбинантная вакцина. Первой вакциной, созданной таким образом, является вакцина против гепатита В, где поверхностный антиген HBsAg гепатита В клонально амплифицируют и продуцируют вакцину из дрожжей с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Вакциной второго типа является вакцина, получаемая посредством элиминации и модификации известных патогенных генов в патогенных микроорганизмах. Разработанная таким образом рекомбинантная вакцина против ротавируса первого поколения проходит клинические испытания в США и Финляндии, и результаты исследования позволяют предполагать, что вакцина обеспечивает сильную защиту против диареи у детей, вызванную ротавирусом. Вакциной третьего типа является вакцина, полученная посредством инсерции гена патогенного микроорганизма в непатогенный микроорганизм, такой как вирус, а затем модифицированный вирус действует как носитель или вектор для

экспрессии чужеродного гена, таким образом, индуцируя иммунный ответ. Эту технологию используют в разработке вакцин против ВИЧ. Ее также используют в разработке вакцин против SARS-CoV-2.

Новые вакцины, такие как синтетические пептидные вакцины, генно-инженерные субъединичные вакцины, вакцины их антиидиотипического антитела и вакцины нуклеиновых кислот обладают такими преимуществами, как хорошая антигенность и низкая токсичность, но они имеют слабую иммуногенность, и их необходимо использовать с эффективными адъювантами. Эти адъюванты включают адъюванты на основе микронизированных антигенов (нерастворимые коллоиды солей алюминия, иммуностимулирующие комплексы, липосомы), антигенные адъюванты с замедленным высвобождением (адъюванты на основе масляных эмульсий, микрокапсулирование антигеной), микробные адъюванты (бактериальные токсины, вакцина *Corynebacterium parvum*, микобактерии и их компоненты, пептидогликан), молекулярные адъюванты (цитокины, молекулы C3d, костимуляторные молекулы, суперантигены, белки теплового шока, CpG-последовательности) и другие адъюванты (витамин E и селен, антибиотики, тимозиновые лекарственные средства, прополис, полисахариды из средств традиционной китайской медицины). Эти адъюванты, в основном, действуют посредством иммунной регуляции, участия в презентировании антигена, индукции ответов CD8<sup>+</sup> Т-клеток и удержания антигена.

Синтетические олигодезоксинуклеотиды, содержащие цитозин-гуаниновые динуклеотидные мотивы (CpG-олигодезоксинуклеотид, CpG ODN), могут стимулировать врожденную иммунную систему высших животных, активировать иммунные клетки, такие как В-клетки, макрофаги (Mφ), дендритные клетки (DC) и NK-клетки, и индуцировать секрецию цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12 и ИФН $\gamma$ . CpG ODN используют в качестве вакцинного адъюванта для индукции сильного иммунного ответа Th1-типа, необходимого для терапевтических вакцин против различных заболеваний, и они проверены на людях и мышах. Исследования на животных показали, что иммунитет, обеспечиваемый CpG ODN в отдельности или в качестве вакцинных адъювантов, защищает против различных вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. CpG ODN можно использовать в отдельности в качестве вакцинного адъюванта, и в исследованиях описано, что ДНК CpG можно использовать в качестве эффективного усилителя специфической иммунизации у мышей, иммунизированных рекомбинантным поверхностным антигеном гепатита В (Heather L. Davis, etc., J Immunol 1998; 160: 870-876). CpG-содержащие одноцепочечные дезоксинуклеотиды используют в качестве адъюванта для вакцин против бешенства, который может значительно усилить эффект иммунизации вакцин против бешенства и снизить количество инъекций вакцин против бешенства (CN1781929A). Результаты клинического испытания фазы III усиленной CpG ODN 1018 ISS вакцины против вируса гепатита В (HEPLISAV), разработанной Dynavax, показали, что индивидуумы в группе HEPLISAV продуцировали протективные антитела на уровнях, схожих с таковыми в группе Engerix-B, вакцины против гепатита В от

GlaxoSmithKline' (Zhao Yujiao, et al., Chinese Journal of Biological Products, Volume 29, Issue 7, July 2016). Кроме того, CpG ODN также можно использовать в комбинации с другими адъювантами в качестве вакцинного адъюванта. В клинических испытаниях описано, что иммуностимулирующий агонист TLR9, олигодезоксинуклеотид CPG 7909, в качестве адъюванта для Engerix-B, повышал иммуногенность вакцины (C.L. COOPER, etc., Journal of Clinical Immunology, Vol. 24, No. 6, November 2004). Гуморальный ответ значительно повышался, когда адъювант CPG 7909 добавляли к вакцине-кандидату против стадии распространения малярии в кровотоке AMA1-C1/Alhydrogel (Vaccine. 2009 June 24; 27(31): 4104-4109). В этих исследованиях обнаружено, что CpG-ODN в отдельности или в комбинации с другими адъювантами (такими как гидроксид алюминия, ISA-51, MF59, ISCOMATRIX, ИЛ-2 и т.д.) могли значительно усиливать антигенспецифические гуморальные и клеточные иммунные ответы. CpG-ODN не только могут усиливать "количество" антигенспецифических иммунных ответов, но также и изменять "качество" антигенспецифических иммунных ответов. Что касается гуморального иммунитета, CpG-ODN не только могут ускорять продукцию антител, повышать титры антител, улучшать avidность антител и усиливать иммунное персистирование, но также и изменять подтипы антител (Chinese Journal of New Drugs 2014, 23(1)).

COVID-19 является новым инфекционным заболеванием, распространяющимся по всему миру. Согласно официальному веб-сайту ВОЗ, на 15 декабря 2020 года было 71581532 подтвержденных случаев COVID-19 и 1618374 летальных случаев. COVID-19 вызван новым коронавирусом (коронавирусом 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2)). Спайковый (S) белок SARS-CoV-2, состоящих из двух субъединиц, S1 и S2, играет ключевую роль в распознавании рецептора и слиянии клеточных мембран. Субъединица S1 содержит рецептор-связывающий домен, распознающий и связывающийся с рецепторным ангиотензинпревращающим ферментом 2 организма-хозяина, в то время как субъединица S2 опосредует слияние вирусной и клеточной мембран посредством образования шестиспирального пучка через два домена с гептадными повторами. Фундаментальная роль S-белка в вирусной инфекции позволяет предполагать, что он является потенциальной мишенью для разработки вакцины, терапевтических средств на основе блокирования антителами и низкомолекулярных ингибиторов. Потенциальные лекарственные средства, нацеленные на S-белок, включают антитела на основе S-белка SARS-CoV-2, ингибиторы слияния и ингибиторы протеаз, нацеленные на участок расщепления S-белка SARS-CoV-2 [Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARSCoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nat Microbiol. 2020;5:562-9].

Адъювантная технология дополнительно подтверждена и использована в разработке вакцин против SARSCoV-2. Усиливая иммунный ответ и улучшая интенсивность иммунного ответа, адъюванты объективно снижают количество необходимого антигена на единицу вакцины, таким образом, повышая мощности

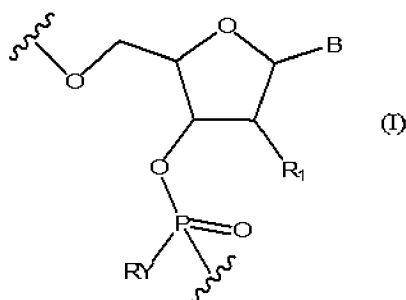
производства вакцин и увеличивая количество иммунизированных людей, что, таким образом, сыграет неизмеримую роль в борьбе людей против вирусов. К настоящему времени по меньшей мере 10 разработчиков лекарственных средств высказались о планах разработки адъювантных вакцин против COVID-19, включая такие компании, как британская GlaxoSmithKline (GSK), австралийская Seqirus и американская Dynavax. Указанные выше компании намерены разработать одобренные адъюванты (AS03, MF59 и CpG 1018, соответственно) и предоставить их другим лицам, разрабатывающим вакцины против COVID-19. В настоящее время на стадии клинических испытаний находится множество адъювантных вакцин, таких как вакцины с наночастицами полноразмерного рекомбинантного гликопротеина SARS CoV-2, содержащие адъювант Matrix-M, разработанный Novavax, вакцины на основе рекомбинантного белка (димера RBD), экспрессируемого в клетках CHO, содержащих адъювант, разработанный совместно Anhui Zhifeilong Kema Biopharmaceutical Co., Ltd./Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, вакцины на основе VLP растительного происхождения, содержащие адъювант AS03, разработанный Medicago, адъювант-содержащие вакцины на основе ДНК-плазмид, совместно разработанные Osaka University/AnGes/Takara Bio, адъювант-содержащие вакцины на основе белковой субъединицы (RBD), разработанные Biological E Ltd, адъювантные пероральные вакцинные платформы на основе аденовируса типа 5 (Ad5), разработанные Vaxart, вакцины на основе рекомбинантного спайкового белка, содержащие адъювант Advax, совместно разработанный Vaxine Pty Ltd/Medytox, вакцины на основе стабилизированного молекулярными зажимами спайкового белка, содержащие адъювант MF59, разработанный совместно University of Queensland/CSL/Seqirus, вакцины на основе белка S-2P+CpG 1018, разработанные совместно Medigen Vaccine Biologics Corporation/NIAID/Dynavax, и вакцины на основе RBD+адъювант, разработанные Cuba's Instituto Finlay de Vacuns. Также существуют патентные документы, в которых описаны вакцины с адъювантами. Например, в CN111956797A описывают применение нового вакцинного адъюванта SF (химически модифицированного циклического динуклеотида) в вакцинах против COVID-19; в CN111991556A описывают вакцину, на основе конъюгированной с RBD SARS-CoV-2 наночастицей, в которую добавлена адъювантная система Sigma и/или AddaVax; в CN111603556A описывают субъединичную нановакцину против COVID-19, содержащую CpG-олигодезоксинуклеотиды.

Данные исследования фазы III для вакцины против COVID-19 Pfizer-BioNTech, свидетельствовали о более высокой частоте лимфаденопатии в группе вакцины по сравнению с плацебо, включая 64 индивидуума в группе вакцины и 6 индивидуумов в группе плацебо, что может быть связано с вакциной, т.к. в ответ на вакцину были вовлечены локальные лимфоузлы. Кроме того, наблюдали расхождение по параличу Белла среди реципиентов вакцины, включая 4 индивидуумов в группе вакцины и 0 индивидуумов в группе плацебо, причина чего неизвестна. Можно видеть, что проблемы с безопасностью вакцин требуют дополнительного исследования и разрешения.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее раскрытие относится к CpG ODN с иммунорегуляторным эффектом. Структуры этих CpG ODN являются новыми, и они имеют иммуностимулирующие эффекты в отношении мышей и людей, синергический эффект при использовании в комбинации с алюминиевыми адьювантами, и таким образом, большое клиническое значение. В частности, настоящее раскрытие позволяет решить существующие в этой области задачи с помощью следующих технических решений:

1. Композиция, содержащая CpG ODN и один или более других адьювантов, действующих совместно с иммуномодулирующим CpG ODN, таких как алюминиевый адьювант, такой как гидроксид алюминия и нерастворимый коллоид соли алюминия, эмульсия "масло-в-воде", микроорганизм и метаболит, нуклеиновая кислота и ее аналог, цитокин, иммуностимулирующий комплекс, прополис и липосома, предпочтительно - алюминиевый адьювант, где CpG ODN содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-4, где по меньшей мере один нуклеотид в нуклеотидной последовательности является химически модифицированным нуклеотидом, имеющим структуру формулы (I):



где Y является S или O, R является H или положительно заряженным противоионом, B независимо представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, и R<sub>1</sub> является H, F, Cl, OH, OMe, Me, O-этилоксиметил.

2. Композиция по п.1, где Y является S.

3. Композиция по п.1 или 2, где все нуклеотиды в нуклеотидной последовательности CpG ODN являются химически модифицированными нуклеотидами, имеющими структуру формулы (I).

4. Композиция по п.3, где последовательность CpG ODN выбрана из SEQ ID NO: 1-4, предпочтительно, полностью фосфотиолированных SEQ ID NO: 1-4.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где количество CpG ODN составляет 10-500 мкг/мл, и количество алюминия в алюминиевом адьюванте составляет 300-600 мкг/мл.

6. Применение композиции по любому из пп. 1-5 в получении вакцины.

7. Применение по п.6, где вакцина является вакциной против гепатита B, вакциной против бешенства, вакциной против COVID-19, такой как вакцина против COVID-19 против SARS-CoV-2 штамма "Альфа", штамма "Бета", штамма "Гамма", штамма "Дельта", штамма "Омикрон", включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантную субъединичную вакцину против COVID-19 и инактивированную вакцину против COVID-

19, вакциной против ветряной оспы, вакциной против гриппа, такой как четырехвалентная вакцина против гриппа.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антиген и композицию по любому из пп. 1-5.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где количество антигена составляет 5-200 мкг/мл, предпочтительно - 5-80 мкг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-9, где количество CpG ODN составляет 100-300 мкг/мл.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-9, где количество алюминия в алюминиевом адъюванте составляет 300-600 мкг/мл.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-11, являющаяся вакциной против гепатита В, вакциной против бешенства, рекомбинантной субъединичной вакциной против COVID-19, инактивированной вакциной против COVID-19, вакциной против ветряной оспы, вакциной против гриппа, такой как четырехвалентная вакцина против гриппа.

13. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 8-12 в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против антигена у индивидуума.

14. Применение по п.13, где фармацевтическая композиция предназначена для введения индивидууму в эффективном количестве, предпочтительно, фармацевтическая композиция предназначена для введения индивидууму дважды с интервалом 2-24 недели.

15. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 8-12, включающий смешивание композиции по любому из пп.1-5, антигена и, необязательно, фармацевтически приемлемого носителя, что приводит к реакции адсорбции, сопряжения и/или эмульгирования, и составление из них инъекционного препарата, перорального препарата или назального спрея.

CpG ODN, используемые в настоящем изобретении включают ODN 1-4, соответственно, имеющие следующие нуклеотидные последовательности:

ODN 1 (5'-tcgacgttcgctcgttcggttc-3');

ODN 2 (5'-tcgcgacgttcgccgacgttcgta-3');

ODN 3 (5'-tcgtcgcacgttcggttcctc-3');

ODN 4 (5'-tcgcgaacgttcgccgcgtacgtacgg-3');

где все нуклеотиды ODN 1-ODN 4 являются фосфотиолированными нуклеотидами.

Настоящее изобретение имеет следующие полезные технические эффекты:

(1) CpG-адъювант по изобретению приводит к синергическому эффекту при использовании в комбинации с алюминиевым адъювантом, и вакцина с двойным адъювантом демонстрирует лучшую иммуногенность, чем вакцина с одним адъювантом;

(2) CpG-адъювант по изобретению может быстро индуцировать продукцию протективных антител и снижать количество иммунизаций при использовании в комбинации с алюминиевым адъювантом. Способ включает введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению. Способ может

дополнительно включать введение индивидууму фармацевтической композиции в эффективном количестве, предпочтительно, фармацевтическую композицию вводят индивидууму дважды с интервалом 2-24 недели. С помощью двукратного введения фармацевтической композиции по изобретению индивидууму можно индуцировать иммунный ответ против антигена у индивидуума и можно достигать уровня протективного гуморального ответа, что уменьшает количество введений и уменьшает весь период иммунизации для индукции иммунного ответа у индивидуума по сравнению с существующим способом индукции иммунного ответа посредством трехкратного введения, что, таким образом, обеспечивает удобство и соблюдение субъектом схемы лечения, когда необходима быстрая защита, или последующие дозы не могут быть гарантированы;

(3) CpG-адъювант по изобретению может приводить к снижению дозы антигена, таким образом, уменьшая угрозы безопасности со стороны вирусных антигенов при производстве и уменьшая объем источников антигена для субъединичной рекомбинантной вакцины, таким образом, увеличивая мощность производства, снижая затраты и улучшая безопасность;

(4) CpG-адъювант по изобретению может приводить к сильному и долговременному протективному эффекту при использовании в комбинации с алюминиевым адъювантом.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фигуре 1 показаны эффекты разных ODN в отношении вакцин против гепатита В.

На фигуре 2 показан эффект ODN 1 в отношении вакцины против бешенства.

На фигуре 3 показан эффект ODN 1 в отношении титров антител против RBD SARS-CoV-2 в сыворотке мышей, иммунизированных рекомбинантными субъединичными вакцинами против COVID-19.

На фигуре 4 показан эффект ODN 1 в отношении титров антител против S1 SARS-CoV-2 в сыворотке мышей, иммунизированных рекомбинантными субъединичными вакцинами против COVID-19.

На фигуре 5 показан эффект ODN 1 в отношении титров нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 в сыворотке мышей, иммунизированных рекомбинантными субъединичными вакцинами против COVID-19.

На фигуре 6 показан эффект разных концентраций ODN 2 в отношении титров антител против S1 SARS-CoV-2 в сыворотке мышей, иммунизированных инактивированными вакцинами против COVID-19.

На фигуре 7 показан эффект ODN 2 в отношении титров антител против S1 SARS-CoV-2 в сыворотке мышей, иммунизированных инактивированными вакцинами против COVID-19, содержащими разные концентрации антигенов.



На фигуре 8 показан специфический титр S1-белка SARS-CoV-2 в сыворотке мышей после иммунизации рекомбинантными субъединичными вакцинами против COVID-19, содержащими разные ODN.

На фигуре 9 показаны экспериментальные результаты из примера 7, свидетельствующие о том, что существует синергический эффект комбинации ODN 1 и адьюванта гидроксида алюминия, и в группе с двойным адьювантом значительно улучшился титр антител против белка gE по сравнению с группой одного алюминиевого адьюванта и группой одного адьюванта ODN 1.

На фигуре 10 показаны экспериментальные результаты из примера 8, включая график (a), на котором показана взаимосвязь между титрами антител против антигена A1 в сыворотке каждой группы и дни после иммунизации, график (b), на котором показана взаимосвязь между титрами антител против антигена A3 в сыворотке каждой группы и дни после иммунизации, график (c), на котором показана взаимосвязь между титрами антител против антигена Bv в сыворотке каждой группы и дни после иммунизации, и график (d), на котором показана взаимосвязь между титрами антител против антигена Bu в сыворотке каждой группы и дни после иммунизации. Как видно на фигуре 10, при сравнении с группой вакцины без адьюванта ODN 1, в группе вакцины с адьювантом ODN 1 быстро индуцировалась продукция протективных антител, значительно улучшалось геометрическое среднее титров антитела против четырех антигенов после иммунизацией четырехвалентными сплит-вакцинами против гриппа.

На фигуре 11 показаны экспериментальные результаты из примера 9, где эксперимент разделен на пять групп: вакцина против бешенства, вакцина против бешенства+ODN 3, 1/2 вакцина против бешенства+ODN 3, вакцина против бешенства+ODN 4 и 1/2 вакцина против бешенства+ODN 4; результаты свидетельствуют о том, что по сравнению с группой вакцины без ODN 3 или ODN 4 в соответствующих группах вакцин с адьювантом ODN 3 или ODN 4 значительно повышались титры нейтрализующих антител в случае вакцин против бешенства. Кроме того, в группах вакцин с адьювантом ODN 3 или ODN 4 могли достигать более высокого эффекта иммунизации в условиях 1/2 содержания антигена, чем в группах с исходным содержанием антигена.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

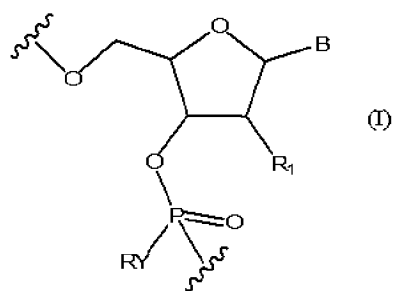
Чтобы сделать цель, техническое решение и преимущества изобретения более очевидными, настоящее изобретение будет дополнительно подробно описано ниже со ссылкой на конкретные примеры и фигуры.

Олигонуклеотиды являются молекулами, образующимися посредством связывания отдельных нуклеотидов, состоящих из сахара (такого как дезоксирибоза или рибоза), фосфатной группы и основания; где молекула сахара и основание соединены с образованием нуклеозида, который затем соединяется с помощью фосфатной группы с образованием нуклеотида. Основания, образующие нуклеозиды, включают пиримидины и пурины; где пиримидин включает тимин (сокращенно обозначаемый как T или t) и

цитозин (сокращенно обозначаемый как С или с); пурин включает аденин (сокращенно обозначаемый как А или а) и гуанин (сокращенно обозначаемый как G или g). Олигонуклеотиды могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В настоящем описании термин "олигодезоксинуклеотид" (ODN) можно заменить его англоязычным сокращением ODN.

"Химическая модификация": по сравнению с природной ДНК, олигонуклеотиды по изобретению могут подвергаться различным химическим модификациям, и участки модификации могут находиться в фосфодиэфирных связях между нуклеозидами, рибозных единицах или/и основаниях (А, Т, С, G, урациле, урдине, сокращенно обозначаемом как U или u). Модификации можно осуществлять во время или после синтеза олигонуклеотида. Химические модификации во время синтеза можно осуществлять внутри или на 5'-конце олигонуклеотида. Синтезированный олигонуклеотид можно химически модифицировать, в качестве неограничивающих примеров, по реакционноспособным группам (таким как фосфат или гидроксильные группы на 5'- или 3'-конец). Конкретные способы этих химических модификаций могут быть понятны специалистам в этой области. Химические модификации по изобретению включают модификации остова олигонуклеотидов, где по меньшей мере один немостиковый атом кислорода фосфата в межнуклеотидной связи заменен атомом серы. Остов олигонуклеотидов также можно модифицировать с помощью неионных аналогов ДНК, такие как алкильные и ароматические углерод-фосфатные соединения (заряженные атомы кислорода углерод-фосфатных соединений заменяют алкильными и ароматическими группами), или атомы кислорода в фосфодиэфирах и алкилфосфат-триэфирах являются алкилированными. Олигонуклеотид также может являться химерой фосфотиоила и фосфодиэфира. Химические модификации также включают замены оснований, такие как замены С-5-пропинпиримидина или 7-деаза-7-замещенного пурина. Химические модификации также включают модификации оснований. Модифицированные основания химически отличаются от типичных оснований, обнаруживаемых в природе, но имеют базовые химические структуры природных оснований. Олигонуклеотиды по изобретению также можно модифицировать с помощью производных цитозина или производных тимидина. В рамках изобретения термин "производные цитозина" относится к цитозин-подобным нуклеозидам (за исключением цитозина). Термин "производные тимидина" относится к тимин-подобным нуклеозидам (за исключением тимина). Кроме того, модификация олигонуклеотида по изобретению также включает соединение гликоля (такого как тетраэтиленгликоль или гексаэтиленгликоль) с обоими или одним концом олигонуклеотида.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к CpG ODN, содержащему или состоящему из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-4, где по меньшей мере один нуклеотид в нуклеотидной последовательности является химически модифицированным нуклеотидом, имеющим структуру формулы (I):



где Y является S или O, R является H или положительно заряженным противоионом, B независимо представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, и R1 является H, F, Cl, OH, OMe, Me, O-этилоксиметил.

В другом варианте осуществления Y является S. В другом варианте осуществления все нуклеотиды в нуклеотидной последовательности CpG ODN являются химически модифицированными нуклеотидами, имеющими структуру формулы (I). В другом варианте осуществления последовательность CpG ODN выбрана из SEQ ID NO: 1-4, предпочтительно, полностью фосфотиолированных SEQ ID NO: 1-4.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей CpG ODN представленный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически приемлемым носителем, известным в этой области для использования в композициях или вакцинных композициях, таких как фосфатный буфер и т.д. Фармацевтически приемлемый носитель также может содержать стабилизаторы для стабилизации антигена, такие как одно или более из мальтозы, альбумина человека, витамина C, цистеина, мочевины, желатина и т.д.

В одном из вариантов осуществления композиция дополнительно содержит один или более других адъювантов, действующих совместно с иммуномодулирующим CpG ODN, таких как алюминиевый адъювант, такой как гидроксид алюминия и нерастворимый коллоид соли алюминия, эмульсия "масло-в-воде", микроорганизм и метаболит, нуклеиновая кислота и ее аналог, цитокин, иммуностимулирующий комплекс, прополис и липосома, предпочтительно - алюминиевый адъювант.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к применению CpG ODN по изобретению для получения адъюванта. В одном из вариантов осуществления адъювант используют для получения вакцины, предпочтительно - для получения вакцины против гепатита B, вакцины против бешенства, рекомбинантной субъединичной вакцины против COVID-19 и инактивированной вакцины против COVID-19.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антиген и композицию, представленную в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления фармацевтической композиции количество антигена составляет 5-200 мкг/мл, предпочтительно - 5-80 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления фармацевтической композиции количество CpG ODN предпочтительно составляет 100-300 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления фармацевтической композиции количество алюминия адъювант предпочтительно составляет 300-600 мкг/мл.

В одном из вариантов осуществления фармацевтической композиции фармацевтическая композиция является вакциной против гепатита В, вакциной против бешенства, рекомбинантной субъединичной вакциной против COVID-19 или инактивированной вакциной против COVID-19.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции по изобретению в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против антигена у индивидуума. В дополнительном варианте осуществления применение дополнительно включает повторное введение индивидууму эффективной дозы фармацевтической композиции с интервалом 2-24 недели.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, включающему последовательно добавление CpG ODN и других адъювантов, антигенов и фармацевтически приемлемых носителей в соотношении доз в контейнер, что приводит к реакции адсорбции, сопряжения и/или эмульгирования, и составление из них инъекционного препарата, перорального препарата или назального спрея.

В одном из вариантов осуществления способа, если другой адъювант является алюминиевым адъювантом, таким как гидроксид алюминия, алюминиевый адъювант сначала смешивают с антигеном для адсорбции, а затем смешивают с CpG ODN для адсорбции.

CpG: С представляет собой цитозин, G представляет собой гуанин, и р представляет собой фосфодиэфирную связь. CpG является метилированным динуклеотидом, состоящим из цитозина и гуанина, связанным фосфодиэфирной связью.

Термин "адъювант" относится к веществам, инъекцируемыми животным перед антигеном или смешиваемым с антигеном одновременно, которые могут повышать иммуногенность антигена. В вакцинах для животных адъюванты могут повышать их иммунную эффективность.

#### **Алюминиевый адъювант**

Алюминиевый адъювант, представленный в настоящем описании, является хорошо известным и общеупотребительным иммунным адъювантом в этой области, который может в значительной степени адсорбировать белковые антигены из раствора и образовывать преципитат. При инокуляции индивидууму алюминиевый адъювант может образовывать "антигенную библиотеку" и медленно высвобождать антиген, таким

образом, значительно продлевать период действия антигена. Алюминиевый адъювант также может стимулировать локальный (в месте инъекции) ответ макрофагов. Алюминиевый адъювант по изобретению можно выбирать из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия и сульфата алюминия.

### **Антиген**

Антигены, представленные в настоящем описании, относятся к веществам, которые могут индуцировать иммунный ответ в иммунной системе организма и могут связываться с продуктами иммунного ответа (антителами и/или эффекторными клетками) *in vivo* или *in vitro* для вызывания специфической реакции, включающей белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты, соединения и т.д.; где белки в качестве антигенов включают модифицированные белки (такие как гликозилированные или метилированные; например, белок циклизуют или присоединяют к липидам) или немодифицированные белки. Антигены, ассоциированные с возбудителями инфекций или заболеваниями, включают антигены, являющиеся частью возбудителя инфекции, такие как белки оболочки, белки капсида, поверхностные белки, токсины, клеточные стенки, антигенные липиды и т.п. Другие подходящие антигены могут включать антигены организма-хозяина, включая индуцированные, модифицированные или гиперэкспрессированные антигены в качестве маркеров инфекции или заболевания. Все такие антигены, полученные или ассоциированные с возбудителями инфекций, инфекциями, состояниями или заболеваниями подходят для использования в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления по изобретению антигены являются антигенами, относящимися к вирусам, включая, в качестве неограничивающих примеров, вирус гепатита, вирус бешенства, SARS-CoV-2 и т.д.

В рамках изобретения термин "вакцина" означает вакцину, хорошо известную специалистам в этой области, и, как правило, относится к любым биологическим продуктам, которые могут индуцировать продукцию специфического гуморального и/или клеточного иммунитета против специфического патогена у индивидуума после инокуляции посредством инъекции или слизистым путем, таким образом, придавая индивидууму защиту или способность элиминировать патогены; вакцины включают белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, живые векторы или возбудителей инфекций и т.д. Вакцины являются аутоиммунными препаратами для профилактики инфекционных заболеваний, получаемых из патогенных микроорганизмов (таких как бактерии, риккетсии, вирусы и т.д.) и их метаболитов посредством искусственной аттенуации, инактивации или генетической инженерии и другими способами. Вакцины сохраняют свойства патогенных бактерий в отношении стимуляции иммунной системы организма животного. Если животное подвергают воздействию такого безопасного патогена, иммунная система будет продуцировать некоторые протективные вещества, такие как иммунные гормоны, активные физиологические вещества, специфические антитела и т.д.; если животное снова подвергают воздействию такого патогена, иммунная система

животного будет следовать своей исходной памяти и продуцировать больше протективных веществ для предотвращения повреждения патогенными бактериями.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Эффект вакцины против гепатита В с ODN 1 в отношении иммунного эффекта у здоровых взрослых**

#### **1. Реагенты**

(1) Рекомбинантная (Hansenula) вакцина против гепатита В (адъювант CpG ODN), производимая Yunnan Walvax Biotechnology Co., Ltd., характеристики вакцины: 0,5 мл/бутыль, содержащие 10 мкг поверхностного антигена вируса гепатита В, ODN 1 250 мкг, содержание алюминия 0,45-0,60 мг/мл (партия № 20151201);

(2) Рекомбинантная (Hansenula) вакцина против гепатита В, производимая Dalian Hissen Bio-pharm Co., Ltd., характеристики вакцины: 0,5 мл/бутыль, содержащие 10 мкг поверхностного антигена вируса гепатита В, и содержание алюминия 0,35-0,62 мг/мл (партия № 201505082).

#### **2. Способы**

48 добровольцев возрастом от 18 до 60 лет, подвергнутых скринингу с отрицательными показателями вируса гепатит В (HBV) и нормальной функцией печени и почек и удовлетворяющих критериям включения и исключения, выбирали в качестве испытуемых. Для проведения исследования использовали способ случайного, слепого и контролируемого дизайна. Индивидуумов разделяли на тестовую группу и контрольную группу в соотношении 1:1, т.е. по 24 человека в каждой группе. Тестовую группу вакцинировали рекомбинантной (Hansenula) вакциной против гепатита В (адъювант CpG ODN), производимой Yunnan Walvax Biotechnology Co., Ltd.; контрольную группу вакцинировали рекомбинантной (Hansenula) вакциной против гепатита В, производимой Dalian Hissen Bio-pharm Co., Ltd. Каждую группу вакцинировали по схеме вакцинации в недели 0, 4 и 24 с помощью одной дозы по 0,5 мл на дозу, вводимой посредством внутримышечной инъекции в кожу дельтовидной мышцы на латеральной стороне плеча. За индивидуумами после вакцинации наблюдали и регистрировали в разные моменты времени и сравнивали различия в частоте различных нежелательных реакций между двумя группами. Образцы крови собирали из всех индивидуумов до первой дозы вакцинации и через 30 дней после второй и третьей доз вакцинации и определяли антитела к поверхностному антигену гепатита В (против HBs) в сыворотке с использованием хемилюминесцентного иммунологического анализа. Образцы крови подвергали детекции на HBsAg и антитела против HBc снова перед первой дозой вакцинации и определяли концентрацию антител против HBs после каждой дозы вакцинации. Концентрацию антител  $\geq 10,0$  мМЕ/мл определяли как антитело-положительную, и концентрацию  $\geq 10000$  мМЕ/мл определяли как сильно антитело-положительную. Сравнивали различия показателя положительности по антителам против поверхностного антигена гепатита В (против HBs) и геометрическое среднее концентрации (GMC) для двух групп.

#### **3. Результаты**

Во время периода наблюдения частота нежелательных явлений составляла 66,67% (16 случаев) в тестовой группе и 54,17% (13 случаев) в контрольной группе ( $P=0,556$ ). Все нежелательные явления имели степень 1 или 2 без нежелательных явлений степени 3 или выше. Как показано в таблице 1, результаты GMC антитела после полной иммунизации свидетельствовали о том, что антитело GMC в полном наборе данных для анализа (наборе FAS) в тестовой группе составляла 2598,56 (95% CI: 1127,90-5986,90) мМЕ/мл, что было выше, чем 371,97 (164,54-840,91) мМЕ/мл в контрольной группе; GMC антитела в протокольном наборе данных (наборе PPS) в тестовой группе составляла 7808,21 (3377,00-18052,00) мМЕ/мл, что было выше, чем [843,22 (95%CI: 213,80-3325,90) мМЕ/мл] в контрольной группе. Показатели положительности по антителам против HBs в наборе FAS (PPS) составляли 95,83% (100,00%) в тестовой группе и контрольной группе. Результаты выраженной положительности по антителам против HBs в наборе FAS (PPS) демонстрировали 79,17% (90,00%) в тестовой группе и 33,33% (50,00%) в контрольной группе. Различия между группами являлись статистически значимыми ( $P=0,003$ ) в наборе FAS, и различия между группами не являлись статистически значимыми ( $P=0,074$ ) в наборе PPS.

Выводы: По сравнению с контрольной вакциной, CpG-вакцина против гепатита В имела лучший профиль безопасности. Кроме того, через 30 дней после второй и третьей доз иммунизаций GMC антитела в тестовой группе была значимо выше, чем в контрольной группе, что свидетельствовало о том, что вакцина против гепатита В с двумя адъювантами (доза 10 мкг), содержащая адъювант CpG и алюминиевый адъювант, имела лучшую иммуногенность, чем вакцина против гепатита В с одним алюминиевым адъювантом (доза 10 мкг) с лучшим эффектом иммунизации на рынке. Кроме того, после второй дозы иммунизации тестовая группа смогла достичь показателя положительности 95%, т.е. с помощью 2 доз тестовой вакцины смогли достичь эффект 3 доз контрольной вакцины, что свидетельствует о том, что инокуляция вакцинами против гепатита В с двумя адъювантами, содержащими адъювант CpG и алюминиевый адъювант, может ускорить продукцию антител против гепатита В против иммунизации, и быстрая индукция протективных антител имела множество преимуществ, особенно в случае если необходима быстрая защита, или последующие дозы не гарантированы. В то же время, в терминах стоимости вакцины и трудозатрат схема с двумя дозами вакцины будет стоить меньше, чем три дозы вакцины.

Таблица 1. Сравнение показателя положительности и GMC антитела между тестовой группой и контрольной группой после вакцинации вакциной против гепатита В

Показатели	FAS			PPS		
	Тестовая группа (количество)	Контрольная группа (количество)	Значение P	Тестовая группа (количество)	Контрольная группа (количество)	Значение P

После второй дозы иммунизации						
ГМС антитела <sup>a</sup>	350,27 (133,14- 921,50)	37,98 (14,65- 98,48)	0,002	265,21 (133,14- 921,50)	14,96 (14,65- 98,48)	0,008
Показатель положительно сти <sup>b</sup>	95,83(23)	79,17(19)	0,188	100,00(10)	66,67(8)	0,096
Выраженный показатель положительно сти <sup>b</sup>	29,17(7)	4,17(1)	0,048	20,00(2)	0,00(0)	0,195
После третьей дозы иммунизации						
ГМС антитела <sup>a</sup>	2598,56 (1127,90- 5986,90)	371,97 (164,54- 840,91)	0,001	7808,21 (3377,00- 18052,00)	843,22 (213,80- 3325,90)	0,008
Показатель положительно сти <sup>b</sup>	95,83(23)	95,83(23)	1,000	100,00(10)	100,00(12)	1,000
Выраженный показатель положительно сти <sup>b</sup>	79,17(19)	33,33(8)	0,003	90,00(9)	50,00(6)	0,074

Примечания: <sup>a</sup>мМЕ/мл (95%CI), различия между двумя группами сравнивали с помощью t-критерия для независимых выборок; <sup>b</sup>% (случаев), различия между двумя группами сравнивали с помощью точного критерия Фишера; ГМС: геометрическое среднее концентрации; FAS: набор данных для полного анализа; PPS: набор данных по протоколу; выражено положительный: антитело против поверхностного антигена гепатита В  $\geq 1000$  мМЕ/мл; тестовая группа: вакцинирована вакциной против гепатита В, содержащей адъювант CpG; контрольная группа: вакцинирована коммерчески доступной вакциной против гепатита В.

### Пример 2. Эффекты разных ODN в отношении вакцины против гепатита В

#### 1. Материалы

ODN 1, ODN 2 и ODN 5 положительного контроля (5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3', где все нуклеотиды являлись полностью фосфотиолированными нуклеотидами) предоставлены Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.;



рекомбинантная вакцина против гепатита В (клетки CHO), характеристики: 1,0 мл, 20 мкг/пробирку, приобретали в North China Pharmaceutical Jintan Biotechnology Co., Ltd.; мышей BALB/c (категории SPF) приобретали в Zhejiang Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.

## 2. Способы

Самок мышей BALB/c массой 15-18 г без предшествующего введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 5 групп. Каждую группу иммунизировали однократно в D1 и D28 по запланированной программе иммунизации посредством внутримышечного введения в левую переднюю большеберцовую мышцу, по 0,1 мл каждый раз. Возраст мышей составлял 5-6 недель на момент первого введения. В запланированное время образцы крови собирали в пробирки для сбора крови посредством пункции сердца или ретроорбитального забора крови, держали при комнатной температуре в течение приблизительно 30-60 минут, а затем центрифугировали. Все образцы центрифугировали при  $1800 \times g$  в течение 15 минут при  $4^{\circ}C$  для получения сыворотки. Уровни антител против HBs в образцах сыворотки определяли с помощью коммерческого набора для детекции антитела против поверхностного антигена гепатита В.

Мышей специально группировали следующим образом:

Группа	тестовое вещество	Объем введения (мл)	Концентрация вакцины против гепатита В (мкг/мл)	Концентрация адьюванта CpG (мкг/мл)	Количество животных (F)	Временная точка забора крови
1	Носитель <sup>a</sup>	0,1	0	0	6	8 недель после введения
2	Вакцина против гепатита В	0,1	20	0	24	2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель после введения
3	ODN 1+Вакцина против гепатита В	0,1	10	125	24	2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель после

						введения
4	ODN 2+Вакци а против гепатита В	0,1	10	125	24	2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель после введения
5	ODN 5+Вакци а против гепатита В	0,1	10	125	24	2 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель после введения

Примечания: а, PBS; F, самки; 6 мышей на точку.

### 3. Результаты

Как показано на фигуре 1, после 2 введений в рамках иммунизации титры антител, продуцирующихся в группах 1/2 антигена (группы 3, 4 и 5), были значимо выше, чем в группе без ODN (группа 2). Уровни титров антител продолжали повышаться через 4 недели, 6 недель и 8 недель после первой иммунизации и достигали наибольшего уровня титра антител в этом эксперименте к неделе 8; где титры антител мышей в группах 4 и 5 выражено повышались к неделе 8, что свидетельствует о том, что концентрации антител могут сохраняться в течение длительного времени.

Вывод: Разные ODN могут приводить к снижению дозы антигена вакцины против гепатита В и достижению сильного и длительного протективного эффекта при комбинировании с вакцинами против гепатита В.

#### **Пример 3. Эффект ODN 1 в отношении вакцины против бешенства**

##### 1. Материалы

ODN 1, предоставленный Changchun Huaru Biotechnology Co., Ltd.;  
вакцина против бешенства из клеток Vero, характеристика: 1 мл/пробирку (содержащая 2,5 ME), полученная из Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd.;  
адъювант гидроксид алюминия, предоставленный Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd.;

мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.

##### 2. Способы

Мышей массой 18-22 г и без введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 8 групп по 8 мышей в каждой группе, 4 самцов и 4 самок. Конкретные группы являлись следующими: вакцина против бешенства, вакцина против

бешенства+гидроксид алюминия, вакцина против бешенства+1,25 мкг ODN 1, вакцина против бешенства+5 мкг ODN 1, вакцина против бешенства+20 мкг ODN 1, вакцина против бешенства+гидроксид алюминия+1,25 мкг ODN 1, вакцина против бешенства+гидроксид алюминия+5 мкг ODN 1, вакцина против бешенства+гидроксид алюминия+20 мкг ODN 1, где концентрация гидроксида алюминия составляла 0,45 мг/мл (в пересчете на содержание алюминия).

Указанную выше вакцину против бешенства, ODN 1 и адъювант гидроксид алюминия разводили и растворяли в PBS в запланированной пропорции. Иммунизация мышей: в день 0, день 7 и день 21 мышей иммунизировали соответствующим образом в зависимости от разных групп. Способом иммунизации являлась интраперитонеальная инъекция, по 0,5 мл на инъекцию. В день 4, день 10 и день 31 собирали кровь из хвостовой вены мышей и разделяли сыворотку. Титр антител вакцины против бешенства в сыворотке мышей определяли с помощью анализа быстрого ингибирования фокусов флуоресценции (RFFIT) вакцины против бешенства. Кровь собирали из хвостовой вены мышей за два дня до иммунизации и полученную сыворотку использовали в качестве отрицательного контроля.

### 3. Результаты

Как показано на фигуре 2, в день 31 титры антител вакцин против бешенства в сыворотке мышей, соответственно, составляли 72,13, 35,79, 186,28, 63,1 и 197,63 ME для групп вакцины против бешенства+гидроксид алюминия, вакцины против бешенства+1,25 мкг ODN 1, вакцины против бешенства+гидроксид алюминия+1,25 мкг ODN 1, вакцины против бешенства+5 мкг ODN 1 и вакцины против бешенства+гидроксид алюминия+5 мкг ODN 1, что свидетельствует о том, что имел место синергический эффект между ODN 1 и адъювантом гидроксидом алюминия; по сравнению с группой одного адъюванта ODN 1 и группой одного адъюванта ODN 1, в группе с двумя адъювантами могли значительно повышать титры антител вакцин против бешенства.

#### **Пример 4. Эффект ODN 1 в отношении рекомбинантной субъединичной вакцины против COVID-19**

##### 1. Материалы

- (1) сухой порошок фосфатного буфера PBS (Solarbio);
- (2) S-белок SARA-CoV-2 (Acro), характеристика: 500 мкг/пробирку, партия № C591P1-20B2F1-UF;
- (3) RBD S-белка SARA-CoV-2(COVID-19) (Acro), характеристика: 100 мкг/пробирку, 100 мг/пробирку, партия № C497P1-207AF1-TJ;
- (4) ODN 1 (Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.), характеристика: 8,3 мг/мл, партия № 202010001;
- (5) мыши BALB/c (категории SPF), предоставленные Zhejiang Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.;
- (6) гидроксид алюминия, предоставленный Zhejiang Tianyuan biopharmaceutical Co., Ltd.

## 2. Способы

Самок мышей BALB/c массой 15-18 г без введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 10 групп, где группа 1 являлась контрольной группой носителя PBS, и группы 2-10 являлись тестовыми группами. Мышей в каждой группе иммунизировали посредством интраперитонеальной инъекции в D0 и D28 по запланированной схеме иммунизации, по 0,2 мл каждый раз. Возраст мышей составлял 5-6 недель на момент первого введения. В запланированное время образцы крови собирали посредством сердечной пункции или ретроорбитального забора крови в D7, D14, D21, D28, D56 и D84, держали при комнатной температуре в течение приблизительно 30-60 минут, а затем центрифугировали. Все образцы центрифугировали при 1800×g в течение 15 минут при 4°C для получения сыворотки. Уровни антитела против S1 и антитела против RBD в образцах сыворотки определяли посредством ELISA сэндвич-типа.

Мышей специально группировали следующим образом:

Группа	Антиген		Адьювант		Количество иммунизированных мышей
	Типы	Содержание (мкг/мл)	Содержание Al (мг/мл)	Содержание CpG (мкг/мл)	
Группа 1	-	0	0	0	12
Группа 2	RBD	25	0	0	30
Группа 3		25	0,45	0	36
Группа 4		7,5	0,45	100	36
Группа 5		25	0,45	100	36
Группа 6		75	0,45	100	30
Группа 7		25	0	100	30
Группа 8		Полноразмерный антиген S	25	0,45	0
Группа 9	25		0,45	100	30
Группа 10	70		0,45	100	30

## 3. Результаты

Результаты показаны на фигурах 3-5. Как видно на фигуре 3, GMT антитела против RBD у мышей в группе 3, группе 7 и группе 5 в день 14 составляли 50, 50 и 1270, соответственно; GMT антитела против RBD в день 21 составляли 200, 50 и 10159, соответственно; GMT антитела против RBD в день 28 составляли 79, 50 и 26390, соответственно; GMT антитела против RBD в день 84 составляли 270, 52 и 51962, соответственно. Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что GMT антитела против RBD могли значительно повышаться во всех группах вакцин с двумя адьювантами с использованием RBD в качестве антигена по сравнению с соответствующей группой вакцины с адьювантом в отдельности, что свидетельствует о том, что ODN 1 и гидроксид алюминия имели синергический эффект. GMT антитела против RBD в день 7 у мышей в

группах 8 и 9 составляли 141 и 800, соответственно; GMT антитела против RBD в день 14 составляли 2425 и 6400, соответственно; GMT антитела против RBD в день 21 составляли 5702 и 45948, соответственно; GMT антитела против RBD в день 28 составляли 4525 и 25600, соответственно; GMT антитела против RBD в день 84 составляли 90000 и 467654, соответственно. Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что GMT антитела против RBD могли значительно повышаться в группах вакцин с двумя адъювантами с S-белком в качестве антигена по сравнению с соответствующей группой вакцины с Al-адъювантом в отдельности.

Как видно на фигуре 4, GMT антитела против S1 в день 7 у мышей в группах 8 и 9 составляли 50 и 400, соответственно; GMT антитела против S1 в день 14 составляли 3200 и 7184, соответственно; GMT антитела против S1 в день 21 составляли 6400 и 52780, соответственно; GMT антитела против S1 в день 28 составляли 12800 и 81275, соответственно; GMT антитела против S1 в день 84 составляли 224825 и 810000, соответственно. Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что GMT антитела против S1 могли значительно повышаться в группах вакцин с двумя адъювантами с S-белком в качестве антигена по сравнению с соответствующей группой вакцины с Al-адъювантом в отдельности.

Как видно на фигуре 5, титры нейтрализующих антител у мышей в группах 8 и 9 в день 21 составляли 40 и 240, соответственно; титры нейтрализующих антител в день 28 составляли 20 и 360, соответственно; титры нейтрализующих антител в день 84 составляли 3840 и 5120 соответственно. Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что титры нейтрализующих антител могли значительно повышаться в группах вакцин с двумя адъювантами с S-белком в качестве антигена по сравнению с соответствующей группой вакцины с Al-адъювантом в отдельности.

Если содержание алюминия и содержание ODN 1 поддерживали на уровне 0,45 мг/мл и 100 мкг/мл, соответственно, (1) с повышением содержания антигена RBD (группы 4-6) сначала повышался титр антител против RBD, а затем снижался, что свидетельствует о том, что антитела, продуцируемые группами вакцин с RBD в качестве антигена, повышались дозозависимым образом, и уровни антител снижались бы, если бы концентрации антигена превышали некоторый диапазон. Этот эксперимент показал, что концентрация продуцируемого антитела будет снижаться, когда концентрация антигена превышает 70 мкг/мл. Оптимальная концентрация антигена составляла 25 мкг/мл. (2) с повышением дозы антигена полноразмерного S-белка (группы 9-10), титры антител против S1 повышались, в то время как титры нейтрализующих антител оставались стабильными, что свидетельствует о том, что уровни антитела против S1 повышались дозозависимым образом, в то время как уровни нейтрализующего антитела не изменялись значительно с повышением дозы антигена.

Выводы: адъювант CpG и алюминиевый адъювант имели синергический эффект, который может значительно повышать титр антитела против RBD, титр антитела против S1 и титр нейтрализующего антитела вакцины, и протективный эффект являлся

долговременным. Комбинация 5-100 мкг/мл антигена с адъювантом CpG (100 мкг/мл) и гидроксидом алюминия (содержание Al 0,45 мг/мл) приводила к лучшим результатам. Повышения титра антитела против S1 и титра антитела RBD, индуцированные адъювантом CpG, являлись более значимыми в группе с полноразмерным S-белком в качестве антигена, чем в группе с RBD в качестве антигена.

### **Пример 5. Эффект ODN 2 в отношении инактивированной вакцины против COVID-19**

#### 1. Материалы

(1) антиген - инактивированная вакцина против COVID-19 была предоставлена Zhejiang Tianyuan biopharmaceutical Co., Ltd.;

(2) ODN 2, предоставленный Changchun Huapu Biotechnology Co., Ltd.;

(3) адъювант гидроксид алюминия, предоставленный Zhejiang Tianyuan biopharmaceutical Co., Ltd.;

(4) мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.

#### 2. Способы

Мышей BALB/c массой 18-20 г выбирали и группировали по 9 или 10 мышей в каждой группе (половина самцов и половина самок); каждую группу иммунизировали посредством интраперитонеальной инъекции в D0 и D14 по запланированной программе иммунизации, с 0,5 мл на инъекцию. В запланированное время кровь собирали в D0, D6, D13, D21 и D28 для отделения сыворотки и все сыворотки тестировали на специфические для S1-белка IgG и нейтрализующие вирус антитела. Статистически вычисляли геометрическое среднее титров IgG сыворотки и нейтрализующих вирус антител в каждой группе животных. Результаты показаны на фигурах 6-7.

Конкретные группы являлись следующими:

Группа	Содержание антигена (мкг/мл)	Содержание Al (мг/мл)	Содержание CpG (мкг/мл)	Количество иммунизированных мышей
G1	0	0,45	0	9
G2		0	400	9
G3		0,45	400	9
G4	2	0,45	0	9
G5		0,45	5	9
G6		0,45	20	9
G7		0,45	40	9
G8		0,45	80	9
G9		0,45	400	9

G10	4	0,45	0	9
G11		0,45	5	9
G12		0,45	20	9
G13		0,45	40	9
G14		0,45	80	9
G15		0,45	400	9
G16	8	0,45	0	9
G17		0,45	5	9
G18		0,45	20	9
G19		0,45	40	9
G20		0,45	80	9
G21		0,45	400	9

Результаты: как показано на фигуре 6, когда содержание антигена инактивированной вакцины против COVID-19 составляло 4 мкг/мл, комбинация 5-80 мкг/мл ODN 2 и гидроксида алюминия (содержание Al 0,45 мг/мл) позволяла достигать значимого повышения GMT антитела против S1 по сравнению с группами без ODN 2. Как показано на фигуре 7, 20 мкг/мл ODN 2 и гидроксид алюминия (содержание Al 0,45 мг/мл) позволяли достигать значимого повышения GMT антитела против S1 при использовании в инактивированной вакцине против COVID-19, содержащей 2-8 мкг/мл антигена.

Выводы: комбинация ODN 2 и гидроксида алюминия может значимо повышать титр антитела против S1 при использовании в инактивированной вакцине против COVID-19. Оптимального эффекта достигали, когда инактивированная вакцина против COVID-19 содержала 5-80 мкг/мл ODN 2, гидроксид алюминия (содержание Al 0,45 мг/мл) и 2-8 мкг/мл антигена.

#### **Пример 6. Эффект разных ODN в отношении рекомбинантной субъединичной вакцины против COVID-19**

##### 1. Материалы

- (1) сухой порошок фосфатного буфера PBS (Solarbio);
- (2) S-белок SARA-CoV-2 (Acro), характеристика: 500 мкг/пробирку, партия № C591P1-20B2F1-UF;
- (3) ODN 2, ODN 3, ODN 4 и ODN 5 положительного контроля (5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), предоставленные Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.;
- (4) адъювант гидроксид алюминия, приобретенный в Sinopharm;
- (5) мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.

##### 2. Способы

Самок мышей BALB/c массой 15-18 г без введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 11 групп по приблизительно 30 мышей в каждой группе. Мышей иммунизировали посредством интраперитонеальной инъекции в D0 и D28, с 0,2 мл каждый раз. Возраст мышей составлял 5-6 недель на момент первого введения. В запланированное время образцы крови собирали посредством сердечной пункции или ретроорбитального забора крови в D7, D14, D28, D56 и D84 после введения, держали при комнатной температуре в течение приблизительно 30-60 минут, а затем центрифугировали. Все образцы центрифугировали при  $1800 \times g$  в течение 15 минут при  $4^{\circ}C$  для получения сыворотки. Уровни антитела против S1 в образцах сыворотки определяли посредством ELISA сэндвич-типа. Результаты показаны на фигуре 8.

Конкретные группы являлись следующими:

Содержание (мкг/мл) Группа	Антиген S-белок	Al	ODN 2	ODN 3	ODN 4	ODN 5
1	0	0	0			
2	25	0	0			
3	25	450	0			
4	25	0	100			
5	25	450	100			
6	25	0		100		
7	25	450		100		
8	25	0			100	
9	25	450			100	
10	25	0				100
11	25	450				100

### 3. Результаты

Как видно на фигуре 8, GMT антитела против S1 в день 7 у мышей в группах 3-11 составляли 111, 80, 700, 73, 550, 30, 317, 70 и 467, соответственно; GMT антитела против S1 в день 28 составляли 1120, 2133, 50667, 1813, 48316, 960, 29333, 1600 и 40333, соответственно; GMT антитела против S1 в день 84 составляли 28223, 34666, 709338, 22667, 641229, 10000, 373330, 16000 и 605329, соответственно. Указанные выше результаты свидетельствовали о том, что имел место синергический эффект между разными CpG ODN и алюминиевыми адъювантами; по сравнению с группой одного алюминиевого адъюванта или группой одного CpG ODN, в группе двойного адъюванта значительно повышался уровень титров антител с долговременным протективным эффектом.

#### **Пример 7. Эффект ODN 1 в отношении вакцины против ветряной оспы**

##### 1. Материалы

Сухой порошок фосфатного буфера PBS, приобретенный в Solarbio;

ODN 1, предоставленный Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.;



Гидроксид алюминия адъювант, purchased from Thermo;  
 Белок gE вируса ветряной оспы, приобретенный в SinoBiological;  
 Мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co.,  
 Ltd.

## 2. Способы

Мышей массой 18-22 г и без введения лекарственных средств выбирали и разделяли на 4 группы по 8 мышей в каждой группе, 4 самца и 4 самки. Мышей специально разделяли на следующие группы: группа 10 мкг белка gE, 10 мкг белка gE+40 мкг гидроксида алюминия, 10 мкг белка gE+5 мкг ODN 1, 10 мкг белка gE+40 мкг гидроксида алюминия+5 мкг ODN 1, где содержание гидроксида алюминия вычисляли в пересчете на содержание алюминия.

Антиген gE, гидроксид алюминия и ODN 1 растворяли и разводили в PBS в запланированных соотношениях. По запланированной программе иммунизации мышей в каждой группе иммунизировали посредством интраперитонеальной инъекции в D0, D28 и D56, с 0,1 мл на инъекцию. По запланированной схеме кровь собирали из хвостовой вены мышей в D0, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49, D56, D63, D70 и D77 для отделения сыворотки и определяли титры антител против белка gE в сыворотке мышей посредством ELISA. Сыворотку, полученную за 7 дней до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля.

## 3. Результаты

Как показано на фигуре 9, в день 35 титры антител против белка gE в сыворотке мышей составляли 190207, 1116680, 430539, и 4870992, соответственно для групп 10 мкг белка gE, 10 мкг белка gE+40 мкг гидроксида алюминия, 10 мкг белка gE+5 мкг ODN 1, 10 мкг белка gE+40 мкг гидроксида алюминия+5 мкг ODN 1, что свидетельствует о том, что имел место синергический эффект между ODN 1 и адъювантом гидроксидом алюминия; по сравнению с группой одного адъюванта ODN 1 и группой одного адъюванта ODN 1, в группе двойного адъюванта значительно повышался титр антител против белка gE.

### **Пример 8. Эффект ODN 1 в отношении четырехвалентной вакцины против гриппа**

#### 1. Материалы

Сухой порошок фосфатного буфера PBS, приобретенный в Solarbio;  
 ODN 1, предоставленный Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.;  
 Антиген вируса гриппа A1, приобретенный в SinoBiological;  
 Антиген вируса гриппа A3, приобретенный в SinoBiological;  
 Антиген вируса гриппа Bv, приобретенный в SinoBiological;  
 Антиген вируса гриппа Bv, приобретенный в SinoBiological;  
 Мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co.,  
 Ltd.

#### 2. Способы

Самок мышей массой 15-20 г и без введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 9 группы. Группы 1-9 являлись, соответственно, группой PBS, группой четырехвалентной сплит-вакцины (QIV), группой четырехвалентной сплит-вакцины+CrG (QIV+CrG), группой 1/2 четырехвалентной сплит-вакцины (1/2 QIV), группой 1/2 четырехвалентной сплит-вакцины+CrG (1/2 QIV+CrG), группой 1/4 четырехвалентной сплит-вакцины (1/4 QIV), группой 1/4 четырехвалентная сплит-вакцины+CrG (1/4 QIV+CrG), группой 1/8 четырехвалентной сплит-вакцины (1/8 QIV), группой 1/8 четырехвалентной сплит-вакцины+CrG (1/8 QIV+CrG), 20 мышей на группу (10 мышей в группе PBS).

Указанные выше четыре антигена вируса гриппа (A1, A3, B<sub>у</sub>, B<sub>в</sub>) и ODN 1 добавляли в PBS в запланированных пропорциях, а затем растворяли для иммунизации мышей. В D0 мышей в каждой группе иммунизировали однократно посредством внутримышечной инъекции во внутреннюю поверхность бедра при объеме инъекции 0,1 мл. 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе QIV, содержали 3,5 мкг каждого из четырех антигенов; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе QIV+CrG, содержали 3,5 мкг каждого из четырех антигенов и 5 мкг ODN 1; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/2 QIV, содержали 1,75 мкг каждого из четырех антигенов; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/2 QIV+CrG, содержали 1,75 мкг каждого из 4 антигенов и 5 мкг ODN 1; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/4 QIV, содержали 0,875 мкг каждого из четырех антигенов; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/4 QIV+CrG, содержали 0,875 мкг каждого из четырех антигенов и 5 мкг ODN 1; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/8 QIV, содержали 0,44 мкг каждого из четырех антигенов; 0,1 мл раствора, используемого для иммунизации каждой мыши в группе 1/8 QIV+CrG, содержали 0,44 мкг каждого из четырех антигенов и 5 мкг ODN 1; животных наблюдали до D49 после иммунизации.

В запланированное по эксперименту время кровь собирали из мышей в каждой тестовой группе (группы 2-9) в D4, D5, D6, D7, D14, D21, D28 и D49 и кровь собирали из мышей в контрольной группе (группе 1) в D7 и D28. Кровь собирали у пяти мышей в каждой группе для каждого участка забора крови. Кровь собирали из ретроорбитального венозного сплетения в D4, D5, D6, и D7 в группах 2-9, и кровь собирали из глазных яблок в D14, D21, D28, и D49. У всех мышей в группе 1 кровь собирали из глазных яблок, и животные после удаления глазных яблок и забора крови умирали в результате запланированного кровопускания. Цельную кровь держали при комнатной температуре в течение приблизительно 30-60 минут, а затем центрифугировали. Все образцы центрифугировали при 1800×g в течение 15 минут при 4°C для получения сыворотки. Геометрическое среднее титров четырех антител в сыворотке мышей определяли посредством ELISA. За день до иммунизации сыворотку 10 мышей перед иммунизацией собирали посредством энуклеации глаз в качестве отрицательного контроля.

### 3. Результаты

На фигуре 10, как можно видеть из геометрического среднего титров четырех антител в сыворотке мышей в D4-D49 после иммунизации, в группе вакцины с адьювантом ODN 1 быстро индуцировали продукцию протективных антител по сравнению с группой вакцины без адьюванта ODN 1. В группах вакцин с добавлением CpG смогли значимо повысить геометрическое среднее титров антител против четырех антигенов после иммунизации четырехвалентными сплит-вакцинами против гриппа, в приблизительно 1-9 раз выше, чем в группе без CpG. Кроме того, в условиях содержания 1/8 антигена в группах вакцин с CpG смогли достичь не меньшего эффекта иммунизации, чем в группах с исходным содержанием антигена.

В целом, адьювант ODN 1 мог быстро индуцировать продукцию протективных антител; значимо повышать титр антител четырехвалентной вакцины против гриппа; снижать количество антигенов и улучшать безопасность вакцины.

#### **Пример 9. Эффект разных ODN в отношении вакцины против бешенства**

##### 1. Материалы

ODN 3 и ODN 4 предоставлены Jiangsu Taipuri Biotechnology Co., Ltd.;

Вакцина против бешенства из клеток Vero, характеристика: 1 мл/пробирку (содержащая 2,5 ME), полученная от Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd.;

Мышей BALB/c приобретали в Charles river Experimental Animal Technology Co., Ltd.

##### 2. Способы

Мышей массой 18-22 г и без введения лекарственных средств в анамнезе выбирали и разделяли на 5 групп по 8 мышей в каждой группе, 4 самца и 4 самок. Группы 1-5 являлись следующими: вакцина против бешенства, вакцина против бешенства+ODN 3, 1/2 вакцины против бешенства+ODN 3, вакцина против бешенства+ODN 4, 1/2 вакцины против бешенства+ODN 4.

Указанную выше вакцину против бешенства из клеток Vero, ODN 3 и ODN 4 разводили и растворяли в PBS в запланированной пропорции, и вакцины против бешенства из клеток Vero в группах 1, 2 и 4 разводили в 100 раз; вакцины против бешенства из клеток Vero в группах 3 и 5 разводили в 200 раз для иммунизации мышей. Как запланировано, мышей в каждой группе иммунизировали однократно в день 0, день 3 и день 7, соответственно. Способом иммунизация являлась внутримышечная инъекция в задние конечности мышей при объеме инъекции 0,1 мл. Содержание ODN 3 или ODN 4 в 0,1 мл раствора для иммунизации мышей в группах 2-5 составляло 5 мкг. В день 4, день 6, день 8, день 10, день 14, день 28 и день 56 кровь собирали из хвостовой вены мышей и отделяли сыворотку. Титры нейтрализующих антител против вируса бешенства в сыворотке мышей определяли посредством анализа быстрого ингибирования фокусов флуоресценции (RFFIT) вакцины против бешенства. Кровь собирали из хвостовой вены мышей за два дня до иммунизации и полученную сыворотку использовали в качестве отрицательного контроля.

### 3. Результаты

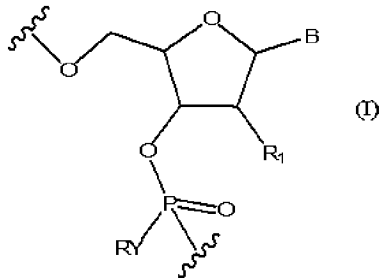
Как показано на фигуре 11, в день 14 титры нейтрализующих антител против вируса бешенства в сыворотке мышей в группах вакцины против бешенства, вакцины против бешенства+ODN 3, 1/2 вакцины против бешенства+ODN 3, вакцины против бешенства+ODN 4 и 1/2 вакцины против бешенства+ODN 4 составляли 15,19, 38,33, 19,63, 34,07, и 29,83, соответственно; результаты свидетельствуют о том, что, по сравнению с группой вакцины без ODN 3 или ODN 4, в соответствующих группах вакцин с адъювантом ODN 3 или ODN 4 смогли значимо повысить титры нейтрализующих антител вакцин против бешенства. Кроме того, в группах вакцин с адъювантом ODN 3 или ODN 4 смогли достичь более высокого эффекта иммунизации в условиях содержания 1/2 антигена, чем в группах с исходным содержанием антигена.

#### **Эквивалентные технические решения**

В конкретных, приведенных выше примерах дополнительно подробно описаны цель, технические решения и полезный эффект настоящего изобретения, но их не следует истолковывать как ограничение объема изобретения. Следует отметить, что любые модификации, эквивалентные замены и улучшения, сделанные специалистами в этой области в рамках сущности и объема изобретения, следует включать в объем настоящего изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая CpG ODN и один или более других адъювантов, действующих совместно с иммуномодулирующим CpG ODN, таких как алюминиевый адъювант, такой как гидроксид алюминия и нерастворимый коллоид соли алюминия, эмульсия "масло-в-воде", микроорганизм и метаболит, нуклеиновая кислота и ее аналог, цитокин, иммуностимулирующий комплекс, прополис и липосома, предпочтительно - алюминиевый адъювант, где CpG ODN содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-4, где по меньшей мере один нуклеотид в нуклеотидной последовательности является химически модифицированным нуклеотидом, имеющим структуру формулы (I):



где Y является S или O, R является H или положительно заряженным противоионом, B независимо представляет собой немодифицированное или модифицированное нуклеиновое основание, и R<sub>1</sub> является H, F, Cl, OH, OMe, Me, O-этилоксиметиллом.

2. Композиция по п.1, где Y является S.

3. Композиция по п.1 или 2, где все нуклеотиды в нуклеотидной последовательности CpG ODN являются химически модифицированными нуклеотидами, имеющими структуру формулы (I).

4. Композиция по п.3, где последовательность CpG ODN выбрана из SEQ ID NO: 1-4, предпочтительно, полностью фосфотиолированных SEQ ID NO: 1-4.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где количество CpG ODN составляет 10-500 мкг/мл, и количество алюминия в алюминиевом адъюванте составляет 300-600 мкг/мл.

6. Применение композиции по любому из пп.1-5 в получении вакцины.

7. Применение по п.6, где вакцина является вакциной против гепатита B, вакциной против бешенства, вакциной против COVID-19, такой как вакцина против COVID-19 против SARS-CoV-2 штамма "Альфа", штамма "Бета", штамма "Гамма", штамма "Дельта", штамма "Омикрон", включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантную субъединичную вакцину против COVID-19 и инактивированную вакцину против COVID-19, вакциной против ветряной оспы, вакциной против гриппа, такой как четырехвалентная вакцина против гриппа.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антиген и композицию по любому из пп.1-5.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где количество антигена составляет 5-200

мкг/мл, предпочтительно - 5-80 мкг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-9, где количество CpG ODN составляет 100-300 мкг/мл.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-9, где количество алюминия в алюминиевом адъюванте составляет 300-600 мкг/мл.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8-11, являющаяся вакциной против гепатита В, вакциной против бешенства, рекомбинантной субъединичной вакциной против COVID-19, инактивированной вакциной против COVID-19, вакциной против ветряной оспы, вакциной против гриппа, такой как четырехвалентная вакцина против гриппа.

13. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 8-12 в получении лекарственного средства для индукции иммунного ответа против антигена у индивидуума.

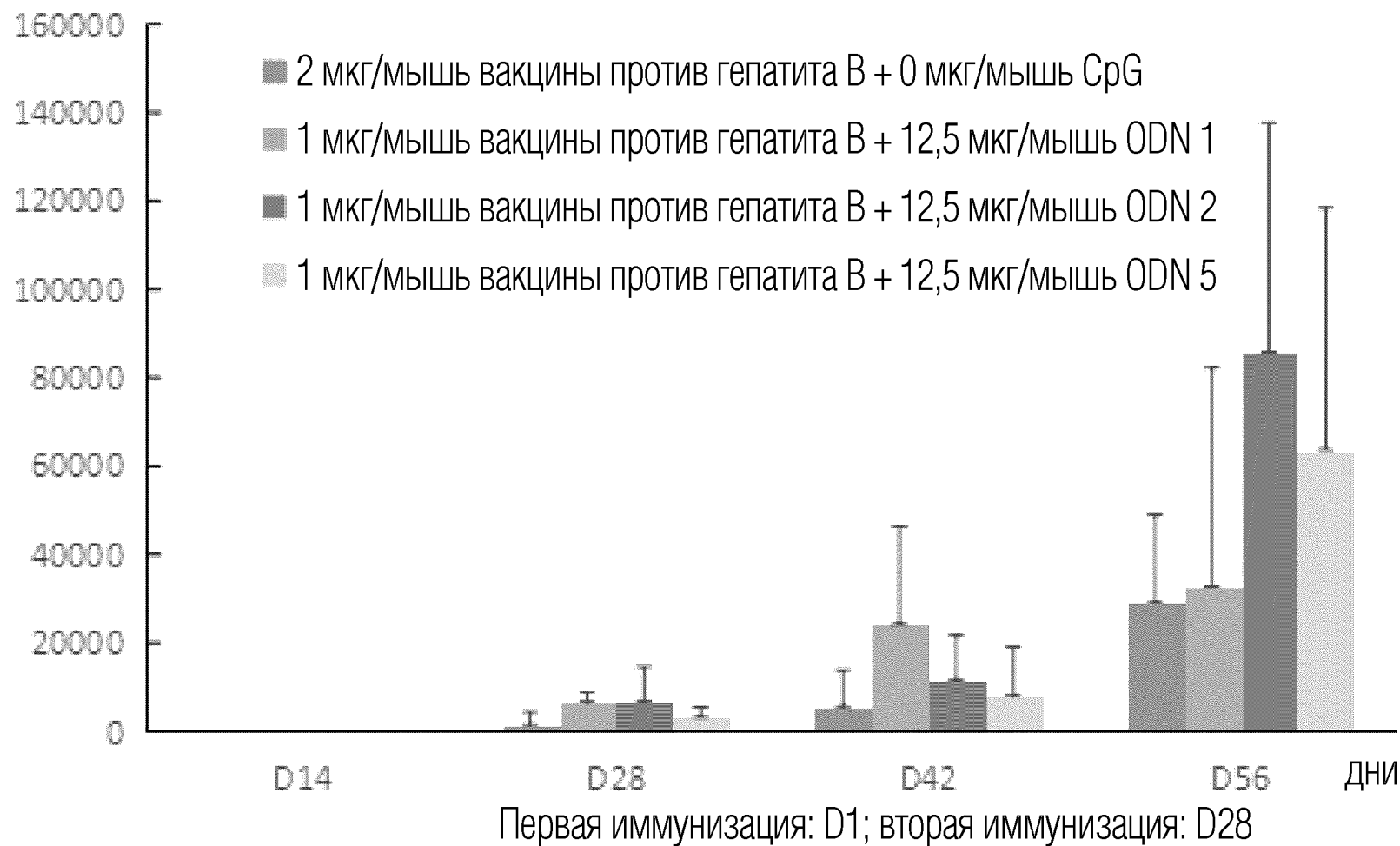
14. Применение по п.13, где фармацевтическая композиция предназначена для введения индивидууму в эффективном количестве, предпочтительно, фармацевтическая композиция предназначена для введения индивидууму дважды с интервалом 2-24 недели.

15. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 8-12, включающий смешивание композиции по любому из пп. 1-5, антигена и, необязательно, фармацевтически приемлемого носителя, что приводит к реакции адсорбции, сопряжения и/или эмульгирования, и составление из них инъекционного препарата, перорального препарата или назального спрея.

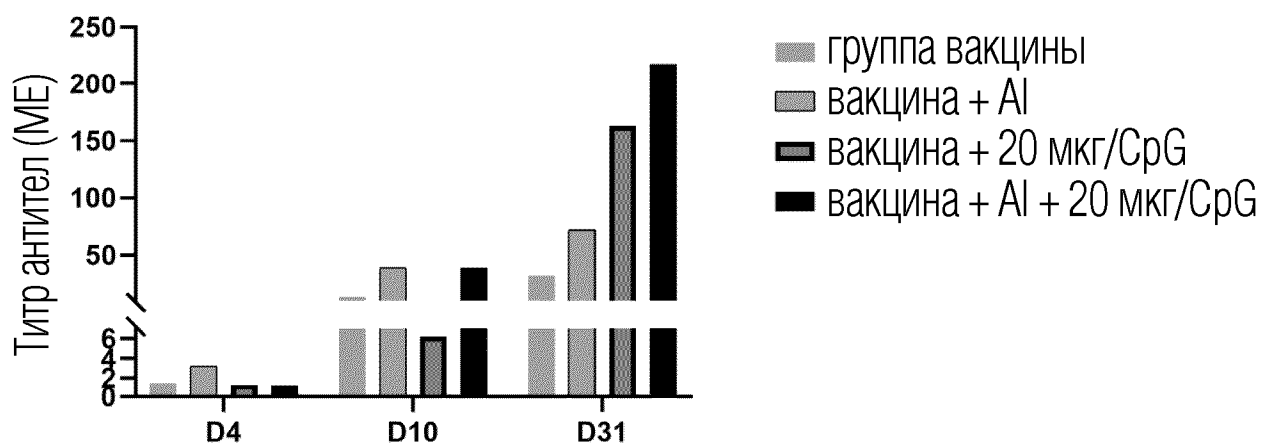
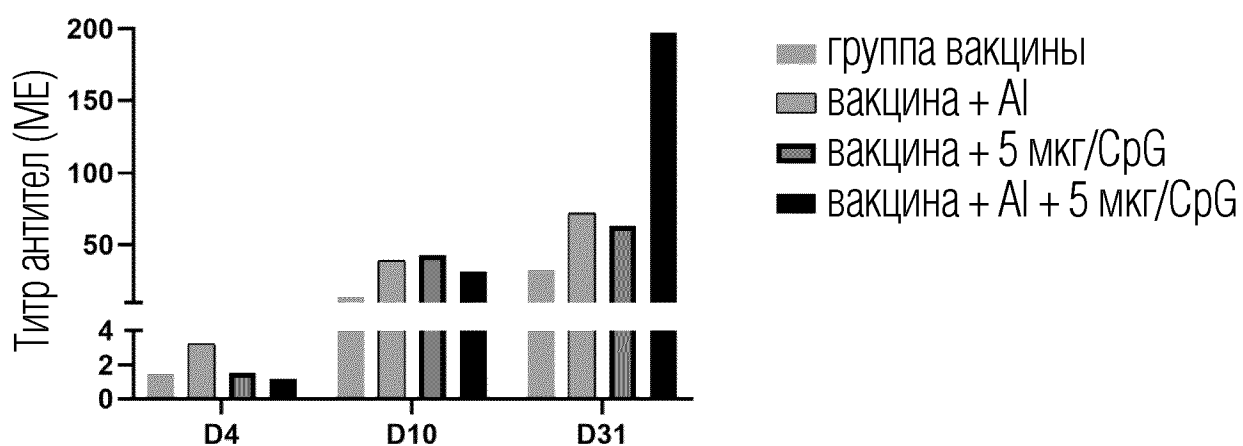
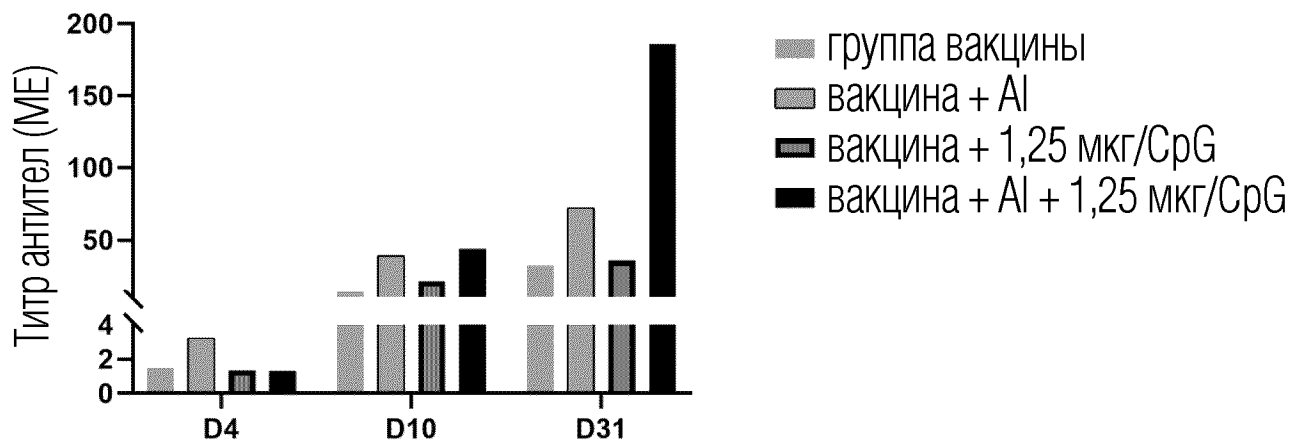
По доверенности

ФИГ. 1

GMT антитела против HBs

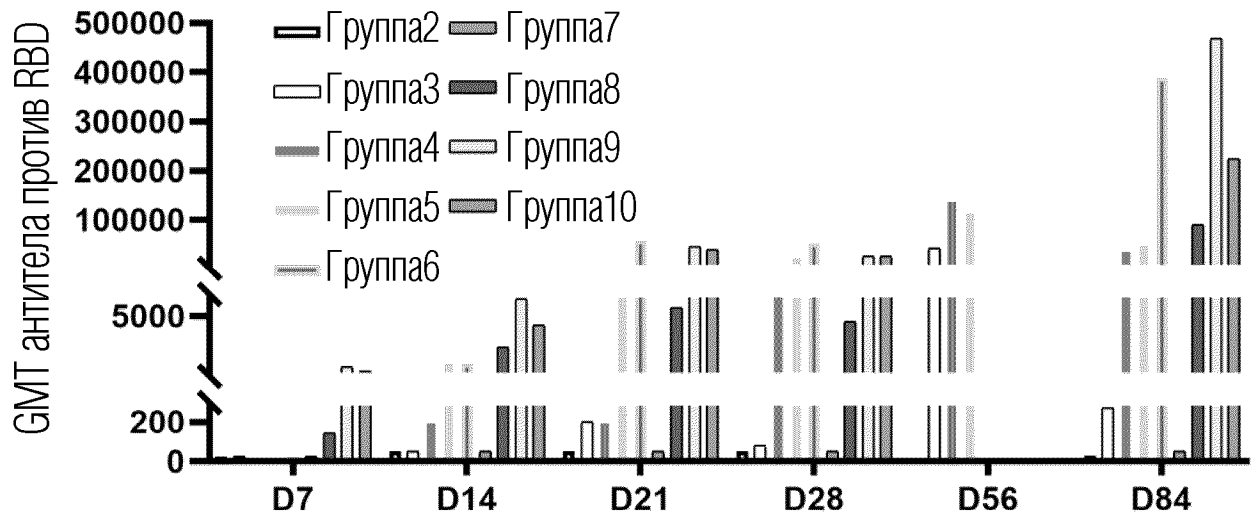


ФИГ. 2

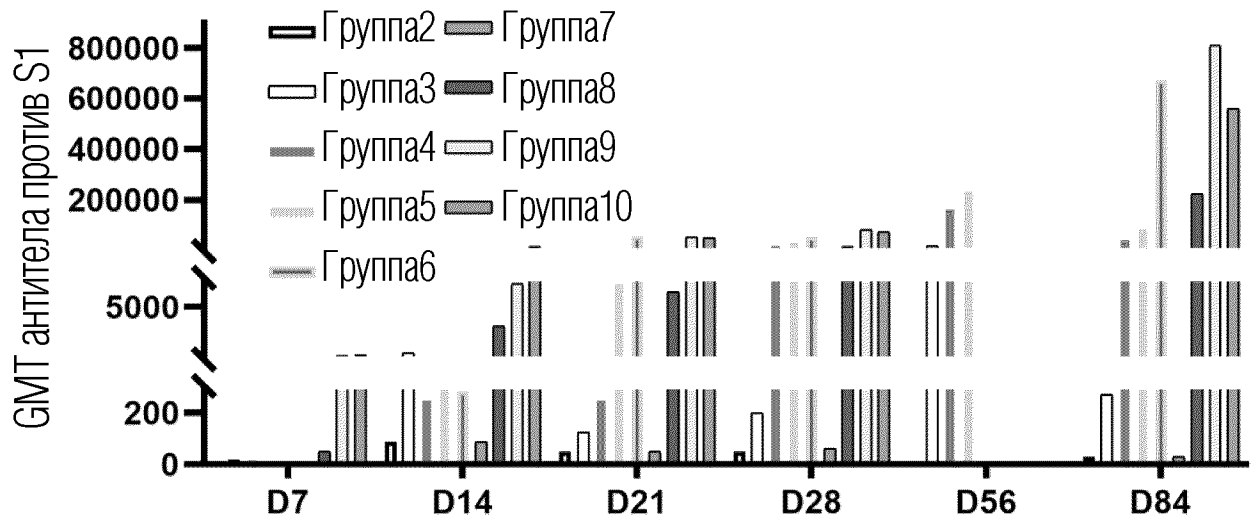




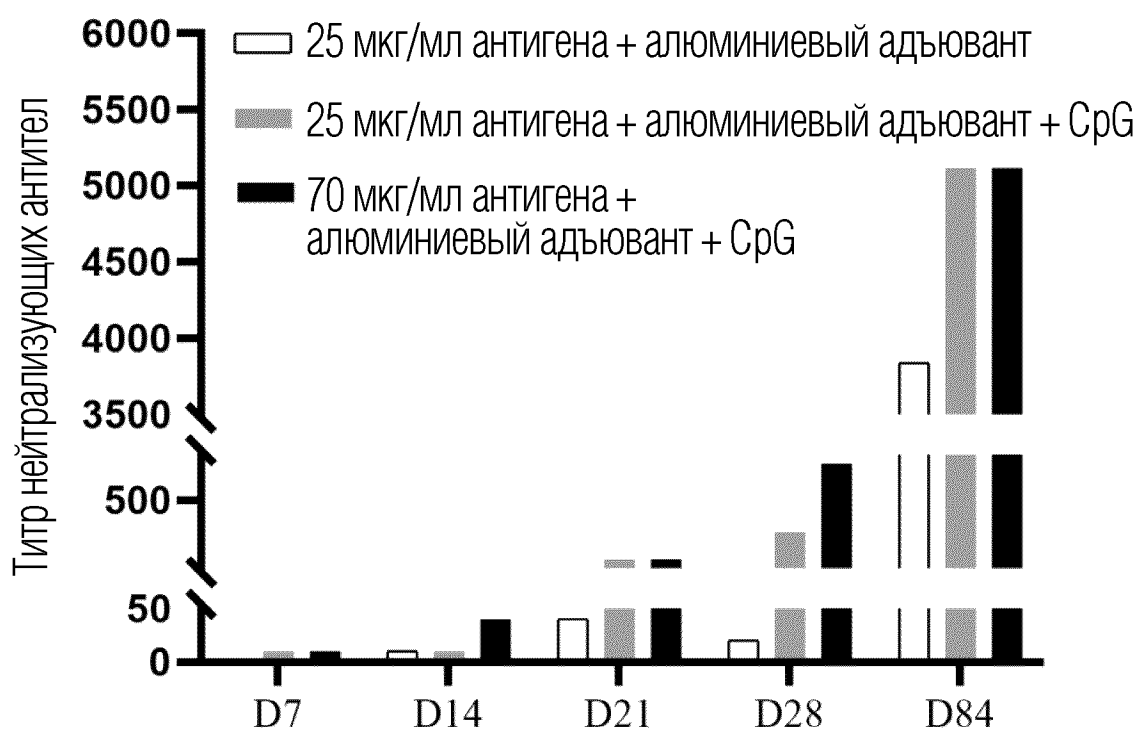
ФИГ. 3



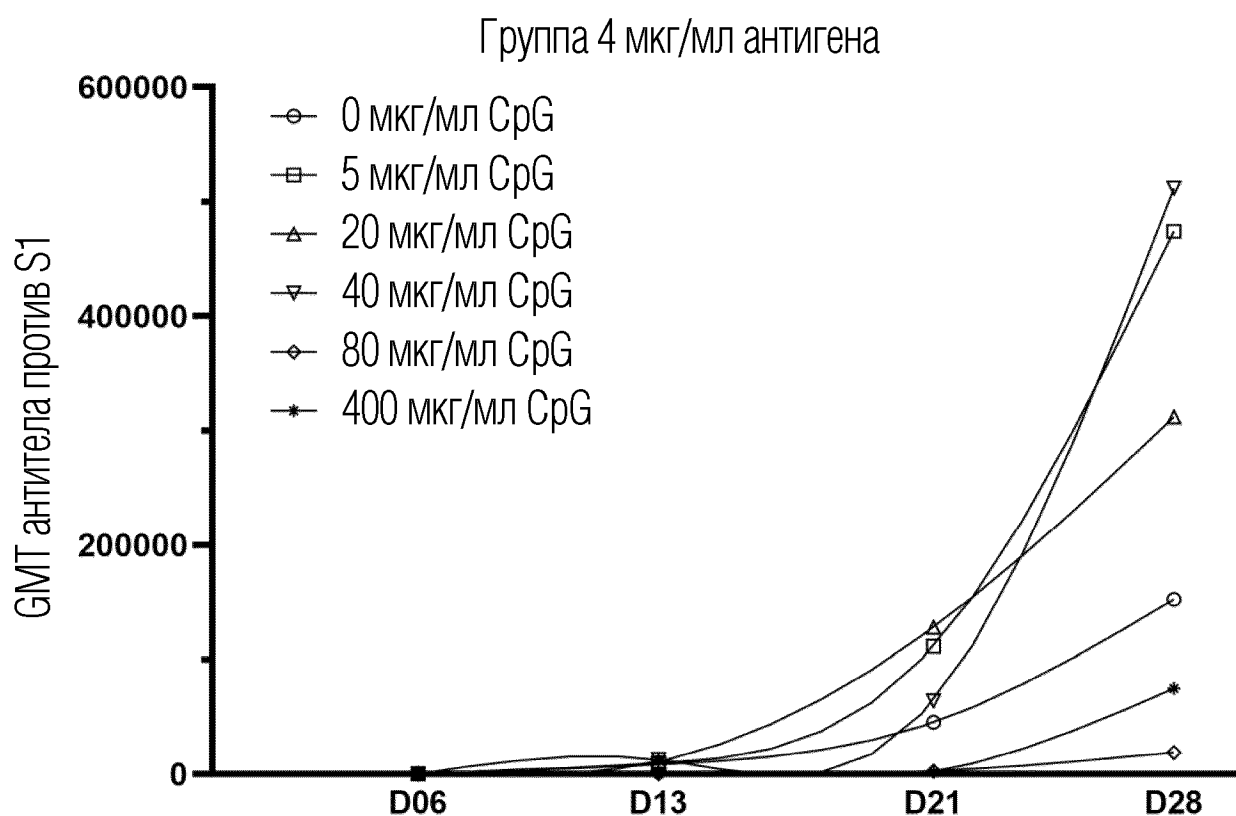
ФИГ. 4



ФИГ. 5

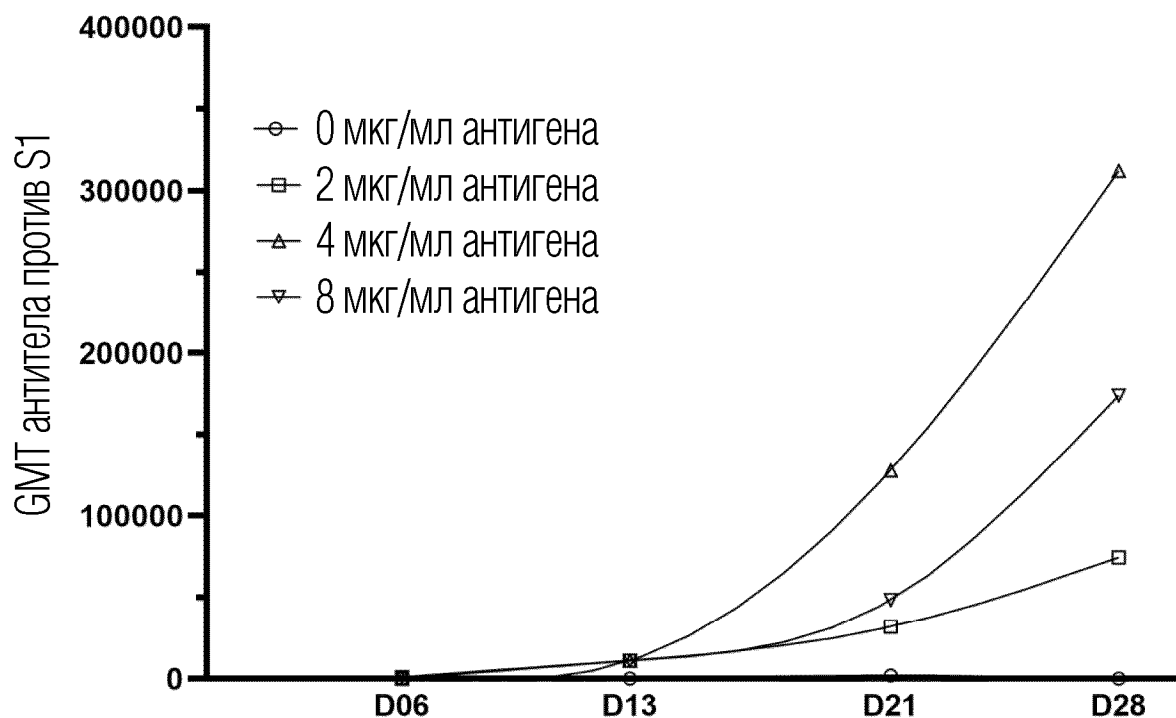


ФИГ. 6

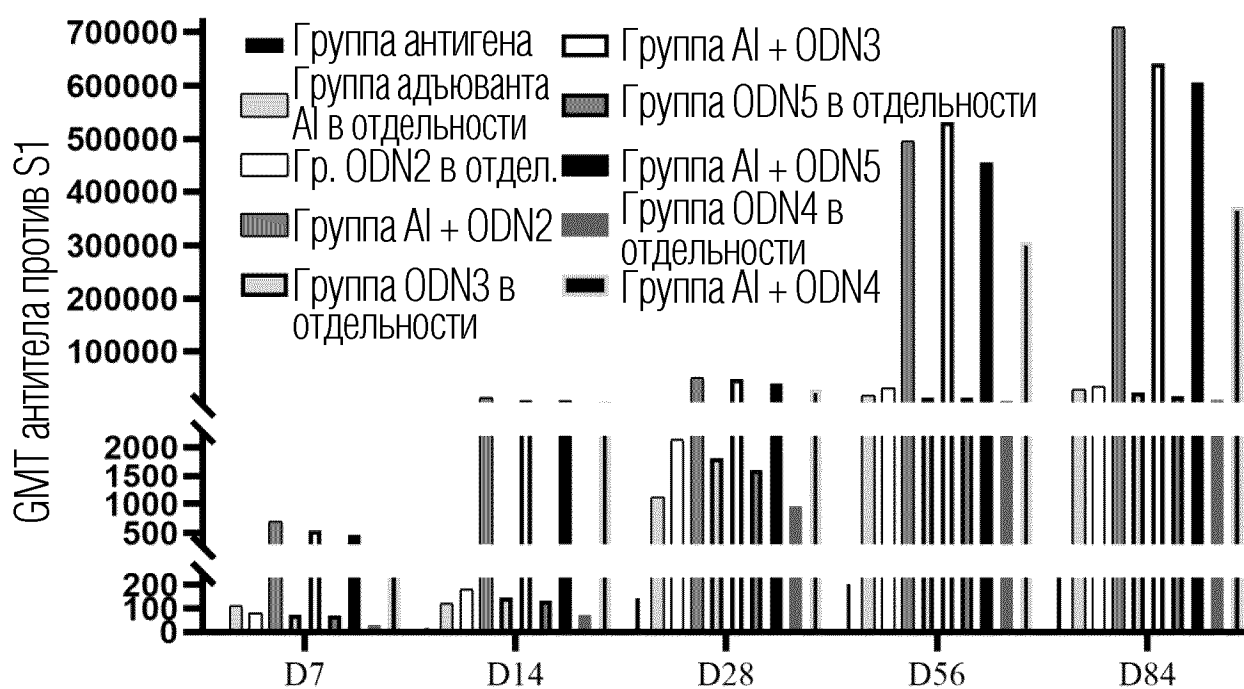


ФИГ. 7

20 мкг/мл CpG

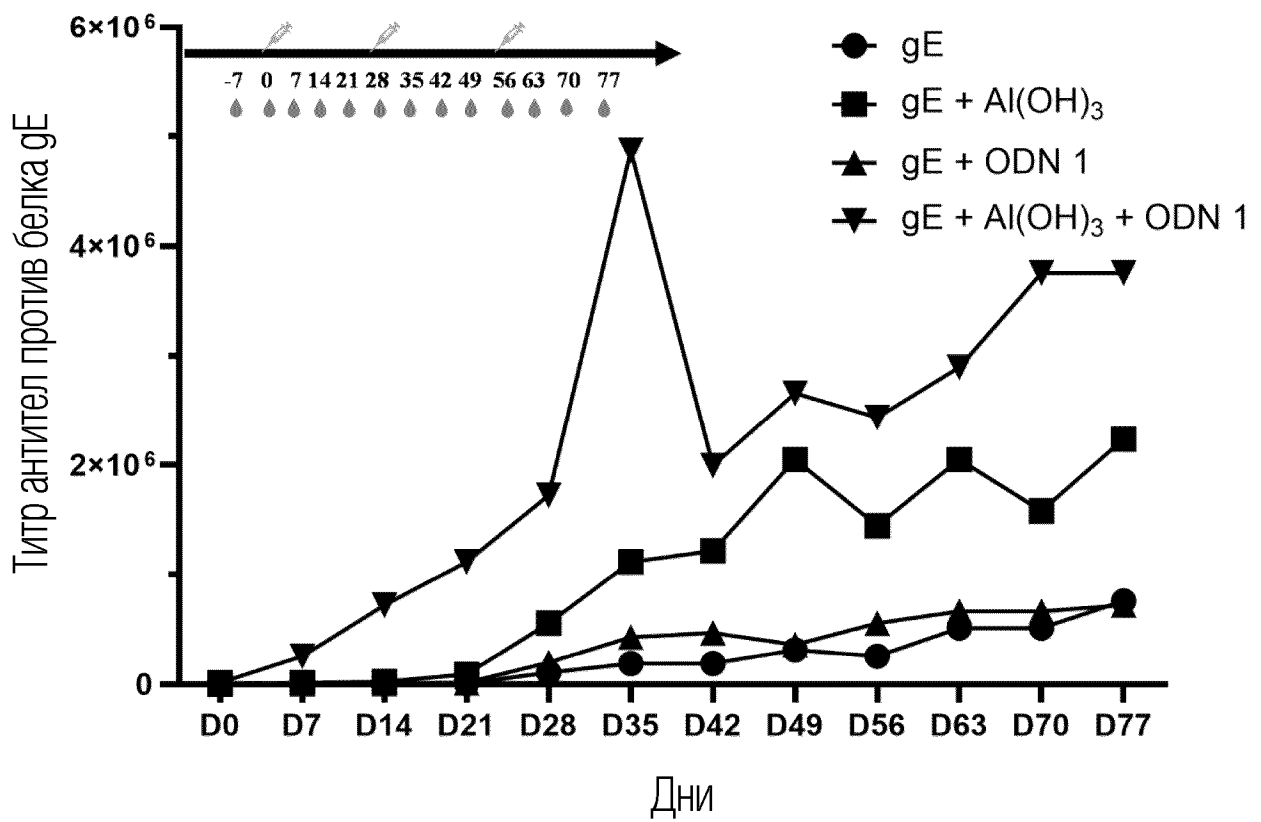


ФИГ. 8

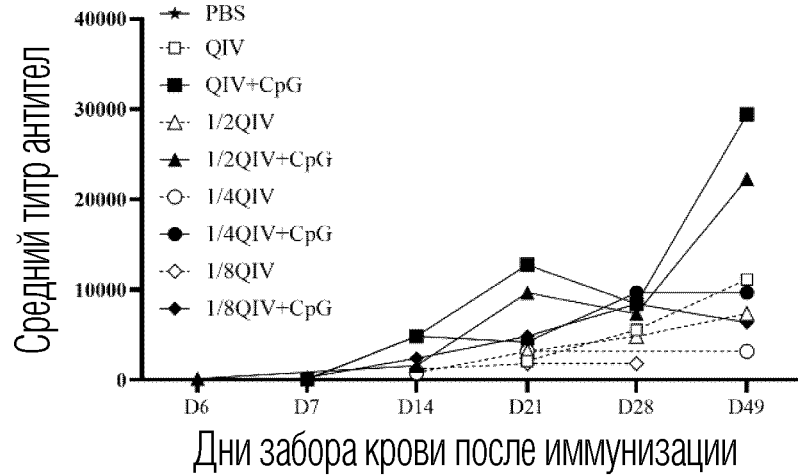


ФИГ. 9

Эффект иммунизации белком gE вируса ветряной оспы

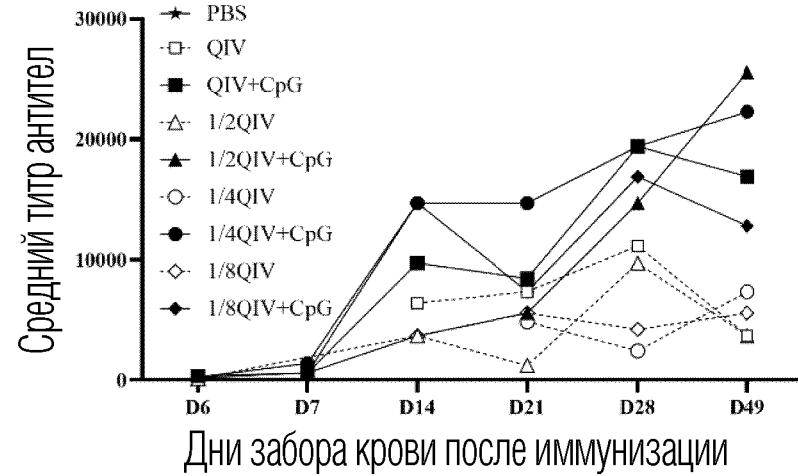


**ФИГ. 10** Титр антител против антигена А1 в сыворотке в каждой группе относительно дней после иммунизации



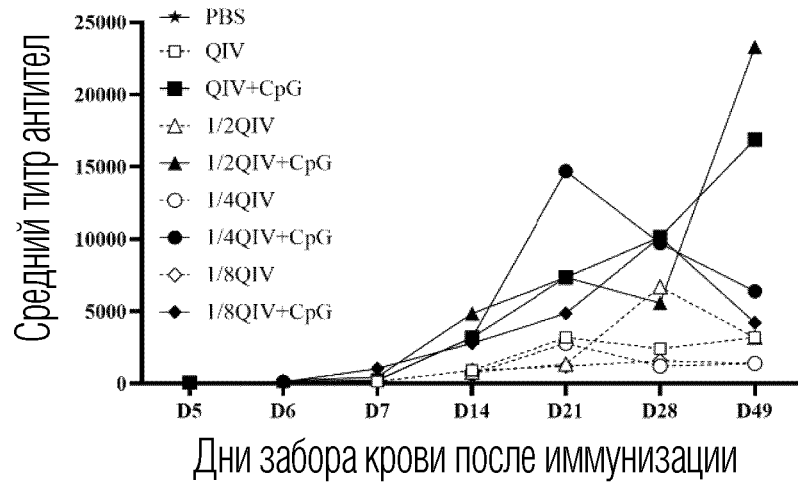
a

Титр антител против антигена А3 в сыворотке в каждой группе относительно дней после иммунизации



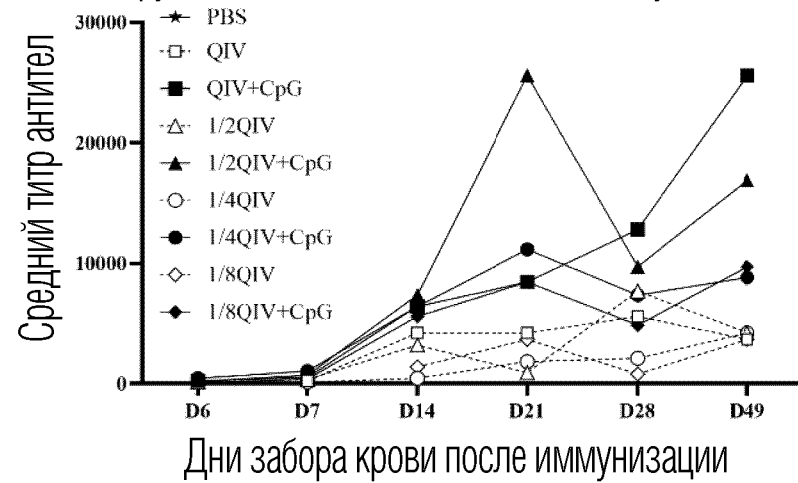
b

Титр антител против антигена Вv в сыворотке в каждой группе относительно дней после иммунизации



c

Титр антител против антигена Вu в сыворотке в каждой группе относительно дней после иммунизации



d

ФИГ. 11

Эффект разных ODN в отношении вакцины против бешенства

