

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490228** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.04.27**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.05.30**

(51) Int. Cl. *C12N 15/117* (2010.01)  
*C12N 15/50* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)  
*A61P 31/16* (2006.01)  
*C07K 14/165* (2006.01)  
*A61K 39/215* (2006.01)  
*A61P 37/04* (2006.01)

(54) **ВЫДЕЛЕННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС НА ОСНОВЕ ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ ГРИППА И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА**

(31) **2021121139**

(32) **2021.07.16**

(33) **RU**

(86) **PCT/RU2022/050173**

(87) **WO 2023/287324 2023.01.19**

(71) Заявитель:

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"БИОКАД"; ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "ИНСТИТУТ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
МЕДИЦИНЫ" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Руденко Лариса Георгиевна, Исакова-Сивак Ирина Николаевна, Степанова Екатерина Алексеевна, Матюшенко Виктория Аркадьевна, Нисканен Сергей Андреевич, Нетеребский Богдан Олегович, Владимирова Анна Константиновна, Яковлев Павел Андреевич, Устюгов Яков Юрьевич, Шеуджен Тимур Мугдинович, Доронин Александр Николаевич, Остроухова Татьяна Юрьевна, Александров Алексей Александрович, Морозов Дмитрий Валентинович (RU)**

(74) Представитель:

**Мельчаева О.А. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, иммунологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа (варианты), рекомбинантному вирусу на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, фармацевтической композиции и вакцине, которые включают вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, а также их применению для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа.

**A1**

**202490228**

**202490228**

**A1**

C07K 14/165 (2006.01)

C12N 15/50 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

**Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа**

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, иммунологии, вирусологии, генетики и молекулярной биологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа (варианты), рекомбинантному вирусу на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, фармацевтической композиции и вакцине, которые включают вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, а также их применению для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Грипп – это острая вирусная инфекция, которая встречается во всем мире. Ежегодные эпидемии гриппа, которые могут поразить до 20% населения, обычно происходят осенью и зимой.

Смертность от респираторных заболеваний, связанных с сезонным гриппом, может быть весьма высокой. В частности, исследование 2017 года показало, что на глобальном уровне ежегодное число таких смертей может достигать до 650 000.

В группы повышенного риска развития тяжелой болезни после заражения гриппом входят люди в возрасте 65 лет и старше, беременные женщины, дети младшего возраста, лица с ослабленным иммунитетом и лица с хроническими патологиями.

Существует 2 основных типа вирусов сезонного гриппа, которые вызывают заболевание у людей: тип А и тип В. Вирусы гриппа А далее подразделяются на подтипы, а вирусы гриппа В подразделяются на линии. Наиболее часто циркулирующие вирусы гриппа А принадлежат к подтипам А(Н1N1) и А(Н3N2), а наиболее часто циркулирующие вирусы гриппа В принадлежат к линиям Ямагата и Виктория.

Ежегодная вакцинация является наиболее эффективным методом предупреждения гриппа и его тяжелых осложнений. В связи с высокой изменчивостью вирусов гриппа ВОЗ обновляет рекомендации по составу вакцины против гриппа два раза в год: в феврале для северного полушария и в сентябре для южного полушария. Рекомендации относительно состава вакцины основаны на данных о вирусах, обнаруженных и охарактеризованных государствами-членами в ходе эпиднадзора.

В патентном документе RU92006182 описывается аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) для получения штаммов живой интраназальной гриппозной вакцины.

В патентном документе RU2556833С2 описывается аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа а/pr/8/59/m2 (h1n1), предназначенный для получения вакцинных штаммов вируса гриппа в качестве донора аттенуации, а также вакцинные штаммы вируса гриппа а/59/м2/калифорния/66/2211 (h2n2) и а/59/м2/токио/67/22111 (h2n2).

В патентном документе RU2563352С2 описывается штамм вируса гриппа А/17/Техас/2012/30 (Н3N2) для производства живой гриппозной интраназальной вакцины для взрослых и для детей.

Несмотря на множество известных вакцинных штаммов вируса гриппа, существует потребность в получении рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа, который обладает улучшенными характеристиками, например, позволяет получать более высокий уровень антител к вирусу гриппа при введении млекопитающему, то есть быть более эффективными при использовании.

Кроме того, на дату подачи данной заявки, заболеваниями, вызванными коронавирусом SARS-CoV-2, заболело более 186 миллионов человек, более 4 миллионов человек умерли от заболеваний, вызванных коронавирусом SARS-CoV-2. Более того, пандемия COVID-19 продолжается и на дату подачи заявки. Существует острая общемировая потребность в эффективных средствах профилактики и лечения заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Таким образом, существует потребность в получении рекомбинантного вируса, который позволит сформировать специфический Т-клеточный иммунитет к коронавирусу и специфический иммунитет к вирусу гриппа, что позволит получить вакцинный штамм, который может быть использован для профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

### **Описание изобретения**

Авторами изобретения была разработана нуклеиновая кислота, которая кодирует рекомбинантный полипептид на основе фрагментов белков коронавируса. Авторами изобретения был разработан рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, который включает вышеуказанную нуклеиновую кислоту. Авторами изобретения были разработаны фармацевтическая композиция и вакцина, которые включают вышеуказанный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, а также различные варианты их применения для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа. Авторы изобретения неожиданно установили, что разработанная нуклеиновая кислота, которая кодирует рекомбинантный полипептид на основе фрагментов белков коронавируса, при встраивании в ген нейраминидазы (NA) или ген NS вируса гриппа позволяет получить рекомбинантный вирус гриппа, который продуцирует более высокий уровень антител к вирусу гриппа при введении млекопитающему, чем вирус гриппа без вышеуказанной вставки. Более того, рекомбинантный вирус гриппа, включающий вышеуказанную нуклеиновую кислоту, которая кодирует рекомбинантный полипептид на основе фрагментов белков коронавируса, позволяет формировать специфический Т-клеточный иммунитет к коронавирусу при введении млекопитающему.

#### *Краткое описание изобретения*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, который включает:

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3;

и, при необходимости, 1 фрагмент из мембранного белка коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5,

где

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса выбирают из группы: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13;

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса выбирают из группы: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21;

фрагмент из мембранного белка коронавируса представляет собой SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает от 1 до 4 фрагментов из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 4 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает от 1 до 4 фрагментов из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает фрагмент мембранного белка коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 или SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, включающей нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, включающий фрагменты из белков коронавируса и содержащий аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, включающей нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76, которые, соответственно, кодируют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид из коронавируса, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид из бета-коронавируса, где бета-коронавирус представляет собой вирус SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из аттенуированного вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из холодоадаптивного вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса гриппа типа H2N2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) или его производных.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот по изобретению, которая находится в гене нейраминидазы (NA) или гене NS вируса гриппа.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, включающая любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов 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 вируса гриппа или вышеуказанной композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа.

В некоторых вариантах осуществления применения любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанная композиция используются для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

В некоторых вариантах осуществления применения специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления применения коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления применения коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцине для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа в эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина используется для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.



В некоторых вариантах осуществления вакцины коронавируса представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления вакцины коронавируса выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления вакцины специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, или индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу или комбинированной профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, и заболеваний, вызванных коронавирусом, включающий введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины, в эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления способа коронавируса представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления способа коронавируса выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления способа специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

#### *Краткое описание чертежей*

Фигура 1 представляет собой схему клонирования антигенных кассет данного изобретения, кодирующих трансген (полиэпитопные кассеты, состоящие из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2) в гене NA вируса гриппа.

Фигура 2 представляет собой схему генетической конструкции на основе вектора для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT, которая содержит последовательности шестого сегмента генома вируса гриппа, в том числе гена NA, а также трансген (полиэпитопную кассету, состоящую из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса

SARS-CoV-2), для получения модифицированных частиц вируса гриппа вакцинного штамма.

Описание элементов для фигур 1-2.

Элемент	Примечание
<b>Энхансер и промотор CMV</b>	Регуляторный элемент, состоящий из энхансера и промотора цитомегаловируса CMV, необходимый для начала транскрипции (+)РНК целевой вставки.
<b>Интрон</b>	Химерная интронная область генов бета-глобина и тяжелой цепи иммуноглобулина человека, увеличивающая стабильность мРНК.
<b>Терминатор транскрипции (-)РНК</b>	Терминирующий транскрипцию вирусной (-)РНК сигнал из гена РНК-полимеразы I мыши.
<b>5'-НТО</b>	5'-нетранслируемая область шестого сегмента генома вируса гриппа, регулирующая трансляцию вирусных генов.
<b>Нейраминидаза (NA)</b>	Полная последовательность нейраминидазы вируса гриппа, необходимой для отделения вирусных частиц от зараженной клетки, а также для предотвращения их агрегации и облегчения движения к клетке-мишени.
<b>P2A</b>	Саморасщепляемый пептид (22 а.о.) вируса porcine teschovirus-1, необходимый для отделения С-концевого трансгена от N-концевого участка нейраминидазы в процессе трансляции.
<b>Трансген</b>	Полиэпитопная кассета, состоящая из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2.
<b>Стоп</b>	Стоп-кодон, необходимый для терминации трансляции мРНК.
<b>Защитный участок РНК</b>	Последовательность из 157 3'-концевых нуклеотидов шестого сегмента генома вируса гриппа, необходимая для упаковки сегмента в капсид (в том числе повторно включает в себя последовательность, кодирующую сорок два С-концевых а.о. нейраминидазы, без их трансляции).
<b>3'-НТО</b>	3'-нетранслируемая область шестого сегмента генома вируса гриппа, выполняющая роль области полиаденилирования для

	терминации транскрипции вирусных генов, а также стабилизации и предотвращения деградации мРНК.
<b>Промотор для (-)РНК</b>	Промотор гена РНК-полимеразы I человека, необходимый для начала транскрипции (-)РНК вируса гриппа для последующей сборки вирионов.
<b>Сигнал полиаденилирования SV40</b>	Дополнительный терминирующий транскрипцию (+)РНК сигнал полиаденилирования вируса SV40.
<b>f1 ориджин</b>	Точка начала одноцепочечной репликации бактериофага f1.
<b>Промотор AmpR</b>	Слабый конститутивный промотор гена бета-лактамазы (BLa) <i>E. coli</i> дикого типа (также обнаружен у транспозона Tn2660). Включает в себя промотор и оператор.
<b>Бета-лактамаза</b>	Ген $\beta$ -лактамазы, обуславливающий устойчивость к ампициллину. Позволяет вести селекцию культуры клеток <i>E. coli</i> .
<b>Область полиаденилирования</b>	Терминирующий транскрипцию гена $\beta$ -лактамазы сигнал полиаденилирования.
<b>Ориджин репликации</b>	Комплексный высококопийный ориджин репликации pUC/pBR322/ColE1/pMB1 – точка начала репликации, функционирующая в клетках прокариот.

Фигура 3 представляет собой схему клонирования антигенных кассет данного изобретения, кодирующих полиэпитопные кассеты, состоящие из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2, в ген NS вируса гриппа.

Фигура 4 представляет собой схему генетической конструкции на основе вектора для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT, которая содержит последовательности восьмого сегмента генома вируса гриппа, в том числе модифицированного гена NS от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57 или его производных, а также трансгена (полиэпитопной кассеты, состоящей из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2), для получения модифицированных частиц вируса гриппа вакцинного штамма.

Описание элементов для фигур 3-4.

<b>Элемент</b>	<b>Примечание</b>
<b>Энхансер и промотор CMV</b>	Регуляторный элемент, состоящий из энхансера и промотора цитомегаловируса CMV, необходимый для начала транскрипции (+)РНК целевой вставки.
<b>Интрон</b>	Химерная интронная область генов бета-глобина и тяжёлой цепи иммуноглобулина человека, увеличивающая стабильность мРНК.
<b>Терминатор транскрипции (-)РНК</b>	Терминирующий транскрипцию вирусной (-)РНК сигнал из гена РНК-полимеразы I мыши
<b>5'-НТО</b>	5'-нетранслируемая область восьмого сегмента генома вируса гриппа от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57, регулирующая трансляцию вирусных генов
<b>NS1 1-126</b>	Фрагмент (1-126 а.о.) модифицированного белка NS1 вируса гриппа (UniProt: P69273) от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57, необходимого для транспорта, сплайсинга и трансляции вирусной РНК.
<b>NS2 (NEP) 1-10</b>	Первый фрагмент (1-10 а.о.) белка NS2 вируса гриппа (также известного как NEP, UniProt: P69266) от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57, необходимого для транспорта вирусной РНК из ядра клетки.
<b>5'-сайт сплайсинга</b>	5'-концевой сайт сплайсинга гена NS вируса гриппа, необходимый для корректной экспрессии NS2.
<b>P2A</b>	Саморасщепляемый пептид (22 а.о.) вируса porcine teschovirus-1, необходимый для отделения С-концевой вставки от N-концевого фрагмента белка NS1 (1-126 а.о.) в процессе трансляции.
<b>Трансген</b>	Полиэпитопная кассета, состоящая из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2.
<b>Стоп</b>	Стоп-кодон, необходимый для терминации трансляции мРНК.
<b>3'-сайт сплайсинга</b>	3'-концевой сайт сплайсинга гена NS вируса гриппа, необходимый для корректной экспрессии NS2.
<b>NS2 (NEP) 11-121</b>	Второй фрагмент (11-121 а.о.) белка NS2 вируса гриппа (также известного как NEP, UniProt: P69266) от донора аттенуации

	A/Leningrad/134/17/57, необходимого для транспорта вирусной РНК из ядра клетки.
<b>NS2 (NEP) 1-121</b>	Полная последовательность белка NS2 вируса гриппа (также известного как NEP, UniProt: P69266) от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57, необходимого для транспорта вирусной РНК из ядра клетки.
<b>3'-НТО</b>	3'-нетранслируемая область 8 сегмента генома вируса гриппа от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57, выполняющая роль поли(А) области для терминации транскрипции вирусных генов, а также стабилизации и предотвращения деградации мРНК.
<b>Промотор для (-)РНК</b>	Промотор гена РНК-полимеразы I человека, необходимый для начала транскрипции (-)РНК вируса гриппа для последующей сборки вирионов.
<b>Сигнал полиаденилирования SV40</b>	Дополнительный терминирующий транскрипцию (+)РНК сигнал полиаденилирования вируса SV40
<b>f1 ориджин</b>	Точка начала одноцепочечной репликации бактериофага f1.
<b>Промотор AmpR</b>	Слабый конститутивный промотор гена бета-лактамазы (BLA) у <i>E. coli</i> дикого типа (также обнаружен у транспозона Tn2660). Включает в себя промотор и оператор.
<b>Бета-лактамаза</b>	Ген $\beta$ -лактамазы, обуславливающий устойчивость к ампициллину. Позволяет вести селекцию культуры клеток <i>E. coli</i>
<b>Область полиаденилирования</b>	Терминирующий транскрипцию гена $\beta$ -лактамазы сигнал полиаденилирования
<b>Ориджин репликации</b>	Комплексный высококопийный ориджин репликации pUC/pBR322/ColE1/pMB1 – точка начала репликации, функционирующая в клетках прокариот

Фигура 5 представляет собой график, который показывает уровни сывороточных IgG антител в сыворотках крови мышей, привитых двукратно рекомбинантными вирусами гриппа, содержащими вставки полиэпитопных кассет коронавируса SARS-CoV-2, в сравнении с вирусным вектором. Указаны данные оптические плотности в ИФА в зависимости от разведения сыворотки. Сравнение данных AUC проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим

множественным сравнением по критерию Тьюки. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

PBS это фосфатно-солевой буфер.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 6 представляет собой график, который показывает уровни сывороточных IgG антител в сыворотках крови мышей, привитых двукратно рекомбинантными вирусами гриппа, содержащими вставки полиэпитопных кассет коронавируса SARS-CoV-2, в сравнении с вирусным вектором. Указаны данные оптические плотности в ИФА в зависимости от разведения сыворотки. Сравнение данных AUC проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

PBS это фосфатно-солевой буфер.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 7 представляет собой график, который показывает уровни сывороточных IgG антител в сыворотках крови мышей, привитых двукратно рекомбинантными вирусами гриппа, содержащими вставки полиэпитопных кассет коронавируса SARS-CoV-2, в сравнении с вирусным вектором. Указаны значения площади под кривой ОП<sub>450</sub> для каждого животного. Сравнение данных AUC проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

PBS это фосфатно-солевой буфер.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 8 представляет собой график, который показывает уровни сывороточных IgG антител в сыворотках крови мышей, привитых двукратно рекомбинантными вирусами гриппа, содержащими вставки полиэпитопных кассет коронавируса SARS-CoV-2, в сравнении с вирусным вектором. Указаны значения площади под кривой ОП<sub>450</sub> для каждого животного. Сравнение данных AUC проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

PBS это фосфатно-солевой буфер.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 9 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров

периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-13 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 10 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-15 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 11 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-16 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 12 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-17 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 13 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-29 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 14 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-30 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9..

Фигура 15 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-31 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9..

Фигура 16 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в

образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-32 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9..

Фигура 17 представляет собой график, который показывает уровни вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (слева) и CD8+ (справа) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови COVID-19 реконвалесцентов после стимуляции вакцинным кандидатом CoVac-33 и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 18 представляет собой график, который показывает вирус-специфических IFN- $\gamma$ -продуцирующих CD4+ (сверху) и CD8+ (снизу) Т-клеток памяти в образцах мононуклеаров периферической крови контрольных доноров после стимуляции вакцинными кандидатами и вирусным вектором ЖГВ H7N9.

ЖГВ H7N9 это живой аттенуированный вирус гриппа H7N9.

Фигура 19 представляет собой сравнение последовательностей фрагментов гликопротеина S различных коронавирусов.

#### *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.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «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.

#### *Вектор*

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

#### *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 вследствие 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, поддающемуся 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*

*Рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, и нуклеиновая кислота его кодирующая*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, который включает:

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса с аминокислотной последовательностью

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS  
NVTWFHAIHVS GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSL LIV  
NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD

LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT  
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSET  
KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNA TRFASVYAWNRKRISN  
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIA  
DYNKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGST  
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN  
KCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS  
VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEH  
VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTN SPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPT  
NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDK  
NTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQY  
GDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLL TDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIP  
FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQN  
AQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSR LDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA  
EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQSAPHGVVFLHVTVVPAQEKN  
FTTAPAICHGDKAHFPREGV FVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVN  
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD VDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLN  
ESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIA GLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCCLKGCCSCGSCC  
KFDEDDSEPV LKGVKLHYT (SEQ ID NO: 1);

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотной последовательностью

MSDNGPQNQRNAPRITFGGPS DSTG SNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQ  
HGKEDLKFPRGQGV PINTNSSPDDQIGYYRATRIRGGDGKMKDLS PRWYFY YLGTG  
PEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAI VLQLPQGTTL PKGFYAEG  
SRGGSQASSRSSSRN SSRNSTPGSSRG TSPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKM  
SGKGQQQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQEL  
IRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQV  
ILLNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQT VTL LPAADLDDFSKQLQQ  
SMSSADSTQA (SEQ ID NO: 3),

и, при необходимости, 1 фрагмент из мембранного белка коронавируса с аминокислотной последовательностью

MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPV  
TLACFVLA AVYRINWITGGIAIAMA CLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFN PETNILL  
NVPLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYYKL  
GASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSSDNIALLVQ (SEQ ID NO: 5),

где

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса выбирают из группы:

DRLNEVA (SEQ ID NO: 7),

FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8),

APHGVVFLHVTYV (SEQ ID NO: 9),

GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10),

ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11),

VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12) или

LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса выбирают из группы:

ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15),

LSPRWYFYYL (SEQ ID NO: 16),

ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17),

QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18),

RQGTDYKHWP (SEQ ID NO: 19),

GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20) или

ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21);

фрагмент из мембранного белка коронавируса представляет собой FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает от 1 до 4 фрагментов из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 4 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.



В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса и 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 4 фрагмента из гликопротеина S коронавируса и 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса и 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, а также 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15 и фрагмент мембранного белка коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, а также 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, а также 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, а также 2 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 и 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 4 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, а также 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который включает 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, а также 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 или SEQ ID NO:36.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность,



которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76.

Любая из вышеуказанных нуклеиновых кислот кодирует рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа. Данный полипептид является полиэпитопной кассетой для Т-клеточного ответа на белки коронавируса. В материалах заявки данный полипептид также называется кассетой по изобретению.

Кассеты по изобретению включают по меньшей мере одну последовательность, которая выбрана из группы:

1) фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (1180-1197 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: QKEIDRLNEVAKNLNESL (SEQ ID NO: 95);

фрагмент (1164-1178 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: EIDRLNEVAKNLNES (SEQ ID NO: 96).

2) Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (1199-1213 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): WLGFIAGLIAIVMVT (SEQ ID NO: 97);

фрагмент (1220-1231 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIVMVT (SEQ ID NO: 98);

фрагмент (1220-1229 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIVM (SEQ ID NO: 99).

3) Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYV (SEQ ID NO: 9).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (1035-1062 а.о.) гликопротеина S вируса SARS-CoV-1, частично совпадающей с таковой у гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): PQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPA (SEQ ID NO: 100);

фрагмент (1056-1078 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTA (SEQ ID NO: 101);

фрагмент (1056-1073 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYVPAQEK (SEQ ID NO: 102);

фрагмент (1055-1073 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): SAPHGVVFLHVTYVPAQEK (SEQ ID NO: 103);

фрагмент (1055-1070 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): SAPHGVVFLHVTYVPA (SEQ ID NO: 104).

4) Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10).

5) Фрагмент (504-522 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSFELLHAPA (SEQ ID NO: 105).

6) Фрагмент (504-516 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSFE (SEQ ID NO: 106).

7) Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (946-971 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1), частично из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFG (SEQ ID NO: 107);

фрагмент (947-970 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: KLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNF (SEQ ID NO: 108).

8) Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12).

9) Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13).

10) Фрагмент (996-1004 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSL (SEQ ID NO: 14).

Кассеты по изобретению включают по меньшей мере одну последовательность, которая выбрана из группы:

1) Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (216-234 а.о.) нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-1, частично совпадающей с таковой у нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GETALALLLLDRLNQLESK (SEQ ID NO: 109);

фрагмент (214-234 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GGDAALALLLDRLNQLESKM (SEQ ID NO: 110);

фрагмент (216-235 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DAALALLLDRLNQLESKMS (SEQ ID NO: 111);

фрагмент (216-234 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DAALALLLDRLNQLESKM (SEQ ID NO: 112);

фрагмент (216-233 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DAALALLLDRLNQLESK (SEQ ID NO: 113);

2) Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYLYL (SEQ ID NO: 16).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (92-118 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLYLGTGPE (SEQ ID NO: 114);

фрагмент (92-117 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLYLGTGP (SEQ ID NO: 115);

фрагмент (98-119 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DGKMKDLSPRWYFYLYLGTGPE (SEQ ID NO: 116).

3) Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17).

4) Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18).

5) Фрагмент (293-302 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): RQGTDYKHWP (SEQ ID NO: 19).

6) Фрагмент (316-324 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующего варианта:

фрагмент (303-337 а.о.) нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-1, частично совпадающей с таковой у нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): PQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGA (SEQ ID NO: 117).

7) Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (340-365 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPP (SEQ ID NO: 118);

фрагмент (341-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DKDPNFKDQVILLNKHIDA (SEQ ID NO: 119);

фрагмент (340-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): DDKDPNFKDQVILLNKHIDA (SEQ ID NO: 120).

Кассеты по изобретению включают, при необходимости, последовательность фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Данный фрагмент может быть представлен в кассетах в составе, например, следующих вариантов:

фрагмент (40-75 а.о.) мембранного белка M вируса SARS-CoV-1, частично совпадающей с таковой у мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): NRNRFLYIHKLVFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWV (SEQ ID NO: 121);

фрагмент (42-75 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): RNRFLYIHKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINW (SEQ ID NO: 122);

фрагмент (50-79 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): KLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITGG (SEQ ID NO: 123);

фрагмент (50-77 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): KLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWIT (SEQ ID NO: 124).

В отдельных вариантах перечисленные выше последовательности использовались в составе конкретных антигенных кассет:

Кассета 1 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVITYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 1 описывает следующая последовательность:

NRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAADVIRINWVGETALALLLDRLNQLES  
KEIDRLNEVAKNLNESWLGFIAGLIAIVMVTTPQAAPHGVVFLHVITYVPSQERNFTTAPA  
(SEQ ID NO: 23)

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 1 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный Слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPNRNRFLYIIKLVFLWLLWPVTLACFVLAADVIRI  
NWVGETALALLLDRLNQLESKEIDRLNEVAKNLNESWLGFIAGLIAIVMVTTPQAAPHG  
VVFLHVITYVPSQERNFTTAPA (SEQ ID NO: 41)

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 41 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 1, включает нуклеотидную последовательность:

AATCGGAACAGGTTTTTGTACATAATAAAGCTTGTTTTCTCTGGCTCTTGTG  
GCCAGTAACACTTGCTTGTGCTTGTGCTGCTGTCTACAGAATTAATTGGGTGGGT  
GAAACTGCCCTCGCGCTATTGCTGCTAGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAGA  
AATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCATGGCTCGGCTTCAT  
TGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACACCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTTGT  
CTTCTACATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACTTCACCACAGCGCCAGC  
A (SEQ ID NO: 59).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 1 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAATCGGAACAGGTTTTTGTACATAATAAAGCTTGTTTTCTCTC  
TGGCTCTTGTGGCCAGTAACACTTGCTTGTGCTTGTGCTGCTGTCTACAGAATTA  
ATTGGGTGGGTGAAACTGCCCTCGCGCTATTGCTGCTAGACAGATTGAACCAGCTTG  
AGAGCAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCATGG

CTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACACCACAAGCAGCCCCG  
CATGGTGTGTCTTCTACATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACTTCACC  
ACAGCGCCAGCA (SEQ ID NO: 77).

Кассета 2 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (316-324 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20).

Антигенную кассету 2 описывает следующая последовательность:

IQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIVMTILL  
CPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGA (SEQ ID NO: 24).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 2 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GS GATNFSLLKQAGDVEENPGPIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK  
WPWYVWLGFIAGLIAIVMTILLCPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGA  
(SEQ ID NO: 42).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 42 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 2, включает нуклеотидную последовательность:

ATTC AAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAA AATTTAAATGAAT  
CACTCATTGACSTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGT  
ATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCT

TTGTCCGCAAATTGCACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCATTCTTTGGAATGTCACGC  
ATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCATGGAGCC (SEQ ID  
NO: 60).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 2 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAA  
TTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTA  
ATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTT  
ACAATCTTGCTTTGTCCGCAAATTGCACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCATTCTTTG  
GAATGTCACGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCATG  
GAGCC (SEQ ID NO: 78).

Кассета 3 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (316-324 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20).

Антигенную кассету 3 описывает следующая последовательность:

PQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHNGAIQKEIDRLNEVAKNLNESLID  
LQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIVMTILLC (SEQ ID NO: 25).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 3 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYH  
GAIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIVMTILLC  
(SEQ ID NO: 43).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 43 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.



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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 3, включает нуклеотидную последовательность:

CCGCAAATTGCACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCATTCTTTGGAATGTCACG  
CATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCATGGAGCCATTCA  
AAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTG  
ACSTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGC  
TCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGT (SEQ ID  
NO: 61).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 3 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCCGCAAATTGCACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCATTCTTT  
GGAATGTCACGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACATGGCTGACTTATCAT  
GGAGCCATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGA  
ATCACTCATTGACSTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTG  
GTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTG  
CTTTGT (SEQ ID NO: 79).

Кассета 4 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 4 описывает следующая последовательность:

QKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTKLIF  
LWLLWPVTLACFVLAAYRINWITDAALALLLDRLNQLESKMSAPHGVVFLHVTYVP  
A (SEQ ID NO: 26).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 4 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK  
WPWYIWLGFIAGLIAIVMVTKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITDAALALLLDRL  
LNQLESKMSAPHGVVFLHVTYVPA (SEQ ID NO: 44).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 44 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 4, включает нуклеотидную последовательность:

CAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTC  
TCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTAC  
ATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAAAGTTAATT  
TTCCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACA  
GAATAAATTGGATCACCGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACC  
AGCTTGAGAGCAAAATGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATG  
TCCCTGCA (SEQ ID NO: 62).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 4 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTT  
AAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAAT  
GGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGA  
CAAAGTTAATTTCCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGC

TGCTGTTTACAGAATAAATTGGATCACCGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGAC  
AGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCAT  
GTGACTTATGTCCCTGCA (SEQ ID NO: 80).

Кассета 5 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVITYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 5 описывает следующая последовательность:

QKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTGGD  
AALALLLDRLNQLESKMSAPHGVVFLHVITYVPAQEKKLIFLWLLWPVTLACFVLAAY  
YRINWITGG (SEQ ID NO: 27).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 5 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK  
WPWYIWLGFIAGLIAIVMTGGDAALALLLDRLNQLESKMSAPHGVVFLHVITYVPAQ  
EKKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITGG (SEQ ID NO: 45).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 45 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 5, включает нуклеотидную последовательность:

CAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTC  
TCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTAC  
ATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAGGCGGTGAT  
GCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCA  
GCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGAAG  
TTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGT  
TTACAGAATAAATTGGATCACCGGTGGA (SEQ ID NO: 63).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 5 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTT  
AAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAAT  
GGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGA  
CAGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGA  
GCAAAATGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCAC  
AAGAAAAGAAGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGT  
GCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAATTGGATCACCGGTGGA (SEQ ID NO: 81).

Кассета 6 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVITYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 6 описывает следующая последовательность:

QKEIDRLNEVAKNLNESLAPHGVVFLHVITYVPAQEKKLIFLWLLWPVTLACFVL  
AAVYRINWITDAALALLLDRLNQLESKMSFIAGLIAIVMVT (SEQ ID NO: 28).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 6 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPQKEIDRLNEVAKNLNESLAPHGVVFLHVITYVP  
AQEKKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWITDAALALLLDRLNQLESKMSFIAGLIAI  
VMVT (SEQ ID NO: 46).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 46 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 6, включает нуклеотидную последовательность:

CAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTC  
TCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGA  
AGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGC  
TGTTTACAGAATAAATTGGATCACCGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAG  
ATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAAT  
GGTGACA (SEQ ID NO: 64).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 6 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTT  
AAATGAATCTCTCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCA  
CAAGAAAAGAAGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTG  
TGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAATTGGATCACCGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCT  
GCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCTTTTATAGCTGGCTTGATTGC  
CATAGTAATGGTGACA (SEQ ID NO: 82).

Кассета 7 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 7 описывает следующая последовательность:

QKEIDRLNEVAKNLNESLAPHGVVFLHVTYVPAQEKDAALALLLDRLNQLESK  
MSFIAGLIAIVMKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITGG (SEQ ID NO: 29).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 7 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GS GATNFSLLKQAGDVEENPGPQKEIDRLNEVAKNLNESLAPHGVVFLHVTYVPA  
AQEKDAALALLLDRLNQLESKMSFIAGLIAIVMKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRIN  
WITGG (SEQ ID NO: 47).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 47 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 7, включает нуклеотидную последовательность:

CAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTC  
TCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGG  
ATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGT

CTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGAAGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATG  
GCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAATTGGATCACC  
GGTGGA (SEQ ID NO: 65).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 7 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTT  
AAATGAATCTCTCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCA  
CAAGAAAAGGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAG  
AGCAAAATGTCTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGAAGTTAATTTTCCTCT  
GGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAA  
TTGGATCACCGGTGGA (SEQ ID NO: 83).

Кассета 8 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVITYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);

Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка M вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 8 описывает следующая последовательность:

QKEIDRLNEVAKNL NESLAPHGVVFLHVITYVPAQEKNFTTAFIAGLIAIVMVTDA  
ALALLLDRLNQLESKKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWITGG (SEQ ID NO: 30).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 8 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPQKEIDRLNEVAKNL NESLAPHGVVFLHVITYVP  
AQEKNFTTAFIAGLIAIVMVTDAALALLLDRLNQLESKKLIFLWLLWPVTLACFVLA  
AYRINWITGG (SEQ ID NO: 48).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 48 может быть кодирован широким

рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 8, включает нуклеотидную последовательность:

CAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTC  
TCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGA  
ACTTCACAACCTGCTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAGATGCTG  
CTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAAAGTTAATTT  
TCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAG  
AATAAATTGGATCACCGGTGGA (SEQ ID NO: 66).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 8 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTT  
AAATGAATCTCTCGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCA  
CAAGAAAAGAACTTCACAACCTGCTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTG  
ACAGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAA  
AAGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTG  
CTGTTTACAGAATAAATTGGATCACCGGTGGA (SEQ ID NO: 84).

Кассета 9 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (1184-1190 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 2, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: DRLNEVA (SEQ ID NO: 7);

Фрагмент (1220-1228 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 8);

Фрагмент (1056-1068 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): APHGVVFLHVTYV (SEQ ID NO: 9);

Фрагмент (218-230 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALALLLLDRLNQL (SEQ ID NO: 15);



Фрагмент (53-73 а.о.) описанного выше мембранного белка М вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 5): FLWLLWPVTLACFVLAAYRI (SEQ ID NO: 22).

Антигенную кассету 9 описывает следующая последовательность:

RNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRINWKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE  
LGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTGGDAALALLLDRLNQLESKMSAPHGVVF  
LHVTVVPA (SEQ ID NO: 31).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 9 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAYRIN  
WKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTGGDAALA  
LLLDRLNQLESKMSAPHGVVFLHVTVVPA (SEQ ID NO: 49).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 49 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 9, включает нуклеотидную последовательность:

AGGAATAGGTTTTTGTATATAATTAAGTTAATTTTCCTCTGGCTGTTATGGCC  
AGTAACTTTAGCTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAATTGGAAAGAAAT  
TGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGA  
ACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTAT  
AGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCT  
GCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCAGCACCTCATGGTGTAGT  
CTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCA (SEQ ID NO: 67).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 9 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGGAATAGGTTTTTGTATATAATTAAGTTAATTTTCCTCTGG

CTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGT TTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAATT  
GGAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATC  
GATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTTG  
GCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAGGCGGTGATGCTGC  
TCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCAGCACC  
TCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCA (SEQ ID NO: 85).

Кассета 10 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17);

Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18).

Антигенную кассету 10 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGHVWVATEGALNTPKD  
HIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGKQLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGYQPYRVV  
VLSFELLHAPA (SEQ ID NO: 32).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 10 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPY  
GANKDGHVWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGKQLQDVVNQNAQ  
ALNTLVKQLSSNFGYQPYRVVLSFELLHAPA (SEQ ID NO: 50).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 50 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-

последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 10, включает нуклеотидную последовательность:

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAG  
ACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAGATCACATT  
GGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACA  
ACATTGCCAAAAGGCAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAATGCACAAGCTTTAAA  
CACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTTACCAACCATAACAGAGTAGTAGT  
ACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 68).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 10 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG  
TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGG  
TGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAA  
AAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTC  
CTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAATGCA  
CAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTTACCAACCATA  
ACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 86).

Кассета 11 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYLYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17);

Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18).

Антигенную кассету 11 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGGKMKDLSRWYFYLLGTGPERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALT  
QHKGEDLGYQPYRVVLSFETEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYA  
EGSRGG (SEQ ID NO: 33).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 11 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGGKMKDLSRWYFYLLGTGPERSGAR  
SKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHKGEDLGYQPYRVVLSFETEGALNTPKDHIGTRNP  
ANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGG (SEQ ID NO: 51).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 51 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 11, включает нуклеотидную последовательность:

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAAGTGGGCCAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAACAACGT  
CGGCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACAT  
GGCAAGGAAGACSTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCT  
GAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAA  
TGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGC  
AGAAGGGAGCAGAGGCGGC (SEQ ID NO: 69).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 11 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG

TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAACGCAGTGGGGCGCGAT  
CAAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTC  
TCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTT  
CTTTTGAAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAAGATCACATTGGCACCCGCAAT  
CCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAA  
GGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGC (SEQ ID NO: 87).

Кассета 12 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12);

Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21).

Антигенную кассету 12 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPKDPNFKDQVILLNKHIDAGKLQDVVN  
QNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIR  
AA (SEQ ID NO: 34).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 12 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPKDPN  
FKDQVILLNKHIDAGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAE  
VQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 52).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 52 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 12, включает нуклеотидную последовательность:

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGGAAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAAAT  
GCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTGGTGCAATTTCA  
AGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATT  
GATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTA  
ATTAGAGCTGCAGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAA  
GCATATTGACGCA (SEQ ID NO: 70).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 12 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG  
TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGGAAAACCTTCAAGATGTGGT  
CAACCAAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTGG  
TGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGA  
AGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGA  
CTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTT  
TGCTGAATAAGCATATTGACGCA (SEQ ID NO: 88).

Кассета 13 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10);

Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17);

Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21).

Антигенную кассету 13 описывает следующая последовательность:

DDKDPNFKDQVILLNKHIDAGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGTEGALNTP  
KDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAGYQPYRVVLSFELLHAPA (SEQ ID NO:  
35).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 13 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPDDKDPNFKDQVILLNKHIDAGKLQDVVNQNA  
QALNTLVKQLSSNFGTEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAGYQPY  
RVVLSFELLHAPA (SEQ ID NO: 53).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 53 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 13, включает нуклеотидную последовательность:

GATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATA  
TTGACGCAGGAAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAACACG  
CTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAA  
GATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCT  
CAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGGTTACCAACCATACAGAGTAGT  
AGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 71).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 13 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTG  
AATAAGCATATTGACGCAGGAAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCACAAGC

TTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTACTGAGGGAGCCTTGAA  
TACACCAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCT  
ACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGGTTACCAACCAT  
ACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 89).

Кассета 14 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10);

Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17);

Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21).

Антигенную кассету 14 описывает следующая последовательность:

DDKDPNFKDQVILLNKHIDANGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKE  
DLGYQPYRVVLSFETEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPGKFYAEGRG  
G (SEQ ID NO: 36).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 14 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPDDKDPNFKDQVILLNKHIDANGERSGARSKQR  
RPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLGYQPYRVVLSFETEGALNTPKDHIGTRNPANNA  
AIVLQLPQGTTLPGKFYAEGRGG (SEQ ID NO: 54).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 54 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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



В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 14, включает нуклеотидную последовательность

GATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATA  
TTGACGCAAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAACAACGTCGGCCCAAGGT  
TTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGAC  
CTTGGTTACCAACCATAACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAAACTGAGGGAGCCTTG  
AATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGT  
GCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCA  
GAGGCGGC (SEQ ID NO: 72).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 14 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTG  
AATAAGCATATTGACGCAAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAACAACGTCG  
GCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGG  
CAAGGAAGACCTTGGTTACCAACCATAACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAAACTGA  
GGGAGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATG  
CTGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAG  
AAGGGAGCAGAGGCGGC (SEQ ID NO: 90).

Кассета 15 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12);

Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYLYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21).

Антигенную кассету 15 описывает следующая последовательность:

DDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPDGKMKDLSRWYFYLYLGTGPEKLQDVV  
NQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVVTQQL  
IRAA (SEQ ID NO: 37).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 15 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPDGKMKD  
LSPRWYFYLLGTGPEKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAE  
VQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 55).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 55 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 15, включает нуклеотидную последовательность

GATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATA  
TTGACGCATACAAAACATTCCCACCAGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGA  
TGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAACTTCAAGATGTGGTCAACCAA  
AATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATT  
TCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAA  
ATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAA  
TTAATTAGAGCTGCA (SEQ ID NO: 73).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 15 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTG  
AATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAGACGGTAAAATGAAAGATCT  
CAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAACTTCAAGATGT  
GGTCAACCAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTT  
TGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCT  
GAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGT  
GACTCAACAATTAATTAGAGCTGCA (SEQ ID NO: 91).

Кассета 16 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12);

Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYLYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21);

Фрагмент (293-302 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): RQGTDYKHWP (SEQ ID NO: 19);

Фрагмент (316-324 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20).

Антигенную кассету 16 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGKMKDLSRWYFYLYLGTGPERQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 38).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 16 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLYLGTGPERQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPKKSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 56).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 56 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие вариантные ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 16, включает нуклеотидную последовательность:

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGG  
CCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCGCATT  
GGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATT  
GGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGA  
CGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGAGTGTTTTAAATGATATCCT  
TTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCA  
GACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCA (SEQ ID  
NO: 74).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 16 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG  
TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAGACAAGGAACTGATT  
ACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAA  
TGTCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTG  
CCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATA  
AGCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGAGTGTTTTA  
AATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTG  
ATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCT  
GCA (SEQ ID NO: 92).

Кассета 17 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12);

Фрагмент (504-515 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области рецептор-связывающего домена (RBD), отвечающего за связывание с рецепторами на поверхности заражаемых клеток: GYQPYRVVLSF (SEQ ID NO: 10);

Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (138-146 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 17);

Фрагмент (160-167 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): QLPQGTTL (SEQ ID NO: 18).

Антигенную кассету 17 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKD  
HIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEV  
QIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRAGYQPYRVVLSFELLHAPA (SEQ ID NO: 39).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 17 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPY  
GANKDGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGALNTLVKQLSSN  
FGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRAGYQPYRVVLS  
SFELLHAPA (SEQ ID NO: 57).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 57 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 17, включает нуклеотидную последовательность:

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAG  
ACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAGATCACATT  
GGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACA  
ACATTGCCAAAAGGCGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGT  
GCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAA

GTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACT  
CAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTGGTTACCAACCATACAGAGTAGT  
AGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 75).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 17 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG  
TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGG  
TGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAA  
AAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCTGCAATCGTGCTACAACCTC  
CTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCT  
CCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGT  
TGAGGCTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGA  
CATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTGGTTACCAACCAT  
ACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCA (SEQ ID NO: 93).

Кассета 18 включает следующие эпитопные фрагменты:

Фрагмент (958-966 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) из области heptad repeat 1, принимающей участие в проникновении вируса в заражаемую клетку: ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 11);

Фрагмент (976-984 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): VLNDILSRL (SEQ ID NO: 12);

Фрагмент (996-1008 а.о.) описанного выше гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1): LITGRLQSLQTYV (SEQ ID NO: 13);

Фрагмент (104-113 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): LSPRWYFYLYL (SEQ ID NO: 16);

Фрагмент (351-359 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 21);

Фрагмент (293-302 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): RQGTDYKHWP (SEQ ID NO: 19);

Фрагмент (316-324 а.о.) описанного выше нуклеопротеина N вируса SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 3): GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 20).

Антигенную кассету 18 описывает следующая последовательность:

RRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLYLGTGPERQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMS  
RIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTPEPKKLQDVVNQ

NAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 40).

При этом следует учитывать, что вышеуказанная антигенная кассета 18 в составе вектора слита с саморасщепляемым пептидом. Данный слитый полипептид имеет следующую последовательность:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPERQGT  
DYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLLDDKDPNFKDQVILLNK  
HIDAYKTFPPTPKKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEV  
QIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA (SEQ ID NO: 58).

Специалисту в данной области будет очевидно, что полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 58 может быть кодирован широким рядом различных ДНК-последовательностей с учетом вырожденности генетического кода. Специалистам в данной области хорошо известно получение таких альтернативных ДНК-последовательностей, кодирующих одни и те же аминокислотные последовательности. Такие варианты ДНК-последовательности находятся в объеме настоящего изобретения.

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

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 18, включает нуклеотидную последовательность

AGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGT  
ATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGG  
CCGCAAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTTCGCGCATT  
GGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATT  
GGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGA  
CGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAACTTCAAGATGTGGTCAACC  
AAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTGCAA  
TTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGC  
AAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAAC  
AATTAATTAGAGCTGCA (SEQ ID NO: 76).

В частном варианте нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенную кассету 18 и саморасщепляемый пептид, включает нуклеотидную последовательность:

GGAAGTGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG  
GAGAACCCTGGACCTAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAG

TCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAAGACAAGGAACTGATT  
ACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAA  
TGTCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTG  
CCATCAAATTGGATGACAAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATA  
AGCATATTGACGCATACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAACTTCAAGAT  
GTGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACCTTAGCTCCAAT  
TTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGG  
CTGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATAT  
GTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCA (SEQ ID NO: 94).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, который содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, включающей нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76, которые, соответственно, кодируют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид из коронавируса, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид из бета-коронавируса, где бета-коронавирус представляет собой вирус SARS-CoV-2.

*Рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному вирусу на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот.

Термин «рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа» (или «вирусоподобная частица на основе вируса гриппа», или «рекомбинантный штамм вируса гриппа») в контексте настоящего описания относится к вирусу гриппа, который включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот, которая кодирует вышеуказанный рекомбинантный полипептид, для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или



профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа. Благодаря своей конструктивной особенности рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа способен продуцировать более высокий уровень антител к вирусу гриппа при введении млекопитающему. Более того, рекомбинантный вирус гриппа, включающий вышеуказанную нуклеиновую кислоту, которая кодирует рекомбинантный полипептид на основе фрагментов белков коронавируса, позволяет формировать специфический Т-клеточный иммунитет к коронавирусу при введении млекопитающему и, таким образом, данный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа может быть использован для комбинированной профилактики заболеваний, вызванных вирусом коронавирусом и заболеваний, вызванных вирусом гриппа.

Под признаком «вирус гриппа» подразумевается вирус из семейства ортомиксовирусов (*Orthomyxoviridae*), включающее в себя монотипные роды *Alphainfluenzavirus* (ранее – вирус гриппа типа А), *Betainfluenzavirus* (ранее – вирус гриппа типа В), *Gammainfluenzavirus* (ранее – вирус гриппа типа С) и *Deltainfluenzavirus* (ранее – вирус гриппа типа D), у которых разделение по родам определяется за счет антигенных свойств рибонуклеопротеинового комплекса. Вирус гриппа представляет собой оболочечный вирус сферической формы диаметром 100–120 нм, внешний слой которого состоит из липидной мембраны, на которой экспонированы основные гликопротеины вируса – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA), – и матриксный белок М2, формирующий ионные каналы. Под липидной мембраной расположен матриксный белок 1 (М1), определяющий форму вирусной частицы. Геном вируса гриппа сегментирован и представлен минус-нитевой РНК, которая находится внутри вириона в виде рибонуклеопротеинового комплекса (РНП). У вируса гриппа типа А 8 фрагментов РНК кодируют, по меньшей мере, 12 белков: НА, М1, М2, NA, NP, NS1, NS2, PA, PA-X, PB1, PB1-F2, PB2. На основании антигенных свойств поверхностных антигенов НА и NA вирусы гриппа А делятся на сероподтипы, например, H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1 и т.д.

В некоторых вариантах выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа представляет собой вакцинные штаммы вируса гриппа.

Вакцинные штаммы характеризуются тем, что содержат гены, кодирующие внутренние и неструктурные белки вируса гриппа (М1, М2, NP, NS1, NS2, PA, PA-X, PB1, PB1-F2, PB2), от специального лабораторного штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) или его производных. Штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) был получен методом холодной адаптации эпидемического вируса А/Ленинград/134/57 (H2N2), путем его 17-кратного пассирования в развивающихся куриных эмбрионах при пониженной до 25°C температуре [Alexandrova G.I., Smorodintsev A.A. Obtaining of an additionally attenuated vaccinating

cryophilic influenza strain// Rev Roum Inframicrobiol. – 1965. – V. 2. – №. – p. 179-189.]. В результате пассажей вирус А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) приобрел набор мутаций в генах, кодирующих поверхностные и внутренние белки вириона (таблица А), которые обусловили его температурочувствительный, холодоадаптированный и аттенуированный фенотип. У штамма была определена первичная нуклеотидная последовательность (номер изолята в базе GISAID EPI\_ISL\_169836, коды доступа генов EPI555079 до EPI555086). Ранее было показано, что мутантный белок PB2 является основным определяющим фактором аттенуированного фенотипа у штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), а полимеразные гены PB1 и PA дополняют этот признак [Klimov A.I., Kiseleva I.V., Alexandrova G.I., Cox N.J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. in Options for the Control of Influenza IV. 2001. Okinawa, Japan: Elsevier Science BV.]. Также была определена роль индивидуальных мутаций в геноме штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в проявлении основного фенотипического признака вируса – чувствительности к повышенным температурам инкубации [Isakova-Sivak I, Chen LM, Matsuoka Y, Voeten JT, Kiseleva I, Heldens JG, den Bosch Hv, Klimov A, Rudenko L, Cox NJ, Donis RO. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). Virology. 2011 Apr 10;412(2):297-305. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.004].

**Таблица А.** Аминокислотные отличия в геноме вирусов Лен/17 и Лен/134

Белок	Положение	Лен/134		Лен/17	
		Амино-кислота	Кодон	Амино-кислота	Кодон
PB2	478	Val	<u>G</u> TA	Leu	<u>T</u> TA
PB1	265	Lys	A <u>A</u> G	Asn	A <u>A</u> T
	591	Val	<u>G</u> TT	Ile	<u>A</u> TT
PA	28	Leu	C <u>T</u> G	Pro	C <u>C</u> G
	341	Val	<u>G</u> TA	Leu	<u>T</u> TA
HA1	181	Asn	A <u>A</u> T	Thr	A <u>C</u> T
	197	Val	<u>G</u> TT	Ile	<u>A</u> TT
	225	Met	A <u>T</u> G	Ile	A <u>T</u> A
HA2	18	Ile	<u>A</u> TT	Val	<u>G</u> TT

NA	366	Ile	<u>A</u> TC	Thr	<u>A</u> CC
M1	15	Ile	<u>A</u> TC	Val	<u>G</u> TC
	144	Phe	TT <u>T</u>	Leu	TT <u>G</u>
NS2	100	Met	AT <u>G</u>	Ile	AT <u>A</u>

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из аттенуированного вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из холодоадаптивного вируса гриппа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса гриппа типа H2N2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) или его производных.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа включает любую из вышеуказанных нуклеиновых кислот по изобретению, которая находится в гене нейраминидазы (NA) или гене NS вируса гриппа.

Под производными вируса A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) понимают:

1) вирусы гриппа типа А, у которых поверхностные антигены HA и NA принадлежат ранее циркулировавшим, потенциально пандемическим, пандемическим или сезонным эпидемическим вирусам гриппа А подтипов H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H5N2, H5N6, H5N8, H6N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, H17N10, H18N11, а гены внутренних и неструктурных белков – штамму A/Ленинград/134/17/57 (H2N2);

2) вирусы гриппа типа А, у которых один и более генов A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) заменены на соответствующие гены любого другого вируса гриппа типа А;

3) вирусы гриппа типа А, имеющие идентичную с A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) аминокислотную последовательность вирусных белков, кодируемых любой нуклеотидной последовательностью (учитывается вырожденность кодонов для ряда аминокислот);

4) вирусы гриппа типа А любого сероподтипа, содержащие аминокислотные остатки во внутренних и неструктурных белках, описанные для донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (PB2-Leu478; PB1-Asn265; PB1-Ile591; PA-Pro28; PA-Leu341; M1-Val15; M1-Leu144; NS2-Ile100), в полном объеме или в различных комбинациях;

5) вирусы гриппа типа А, последовательность внутренних и неструктурных белков которых (M1, M2, NP, NS1, NS2, PA, PA-X, PB1, PB1-F2, PB2) отличается от вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) на ряд аминокислот;

б) вирус гриппа А любого серотипа, содержащий модифицированные гены штамма А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (учитывается укорочение рамки считывания NS1 гена).

#### *Фармацевтическая композиция/вакцина*

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, включающая любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения действующее вещество в вышеуказанных композициях находится в эффективном количестве, например, в биологически эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения действующее вещество в вышеуказанных композициях находится в эффективном количестве, например, в терапевтически эффективном количестве.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа 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 вируса гриппа 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 солюбилизаторы.

«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 трансдукции клетки *ex vivo* или для введения *in vivo* рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа 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 вируса гриппа, 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 индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, которая включает любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа в эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина используется для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

Под коронавирусом подразумеваются вирусы из семейства коронавирусы (Coronaviridae).

Данное семейство включает род альфа-коронавирусы (Alphacoronavirus) и род бета-коронавирусы (Betacoronavirus).

Род альфа-коронавирусы (Alphacoronavirus) включает:

- 1) коронавирус человека 229E - вызывает ОРВИ;
- 2) Коронавирус человека NL63 - вызывает ОРВИ.

Род бета-коронавирусы (Betacoronavirus) включает:

- 1) коронавирус человека OC43 - вызывает ОРВИ;
- 2) коронавирус человека HKU1 - вызывает ОРВИ;
- 3) MERS-CoV;
- 4) SARS-CoV;
- 5) SARS-CoV-2.

Вышеуказанная фармацевтическая композиция или вакцина могут быть использованы для профилактики заболеваний, вызванных любым из вышеуказанных коронавирусов.

В некоторых вариантах осуществления вакцины коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления вакцины коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления вакцины специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

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.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина включает рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, который содержится предпочтительно в биологически эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцина включает рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа, который содержится предпочтительно в терапевтически эффективном количестве.

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 вируса гриппа или вышеуказанной композиции для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа.

В некоторых вариантах осуществления применения любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанная композиция используются для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

Любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанная композиция могут применяться для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом, где под коронавирусом подразумеваются вирусы из семейства коронавирусы (Coronaviridae), в частности, альфа-коронавирусы, которые включают коронавирус человека 229E или коронавирус человека NL63, и бета-коронавирусы, которые включают коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления применения специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления применения коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления применения коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, или индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу или комбинированной профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, и заболеваний, вызванных коронавирусом, включающий введение в организм млекопитающих любого из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанной композиции или вышеуказанной вакцины, в эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления способа коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

В некоторых вариантах осуществления способа коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления способа специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

Любой способ введения рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа 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.

Предпочтительным способом введения вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа по данному изобретению является интраназальное введение.

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

Рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по данному изобретению вводят в организм в эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по данному изобретению предпочтительно вводят в организм в биологически эффективном количестве.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по данному изобретению предпочтительно вводят в организм в терапевтически эффективном количестве.

Дозировки вышеуказанного рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа 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  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  инфекционных единиц или больше, предпочтительно от  $10^7$  до  $10^8$  инфекционных единиц.

Любой из вышеуказанных рекомбинантных вирусов на основе вируса гриппа или вышеуказанная композиция может применяться для индукции специфического иммунитета к вирусам из семейства коронавирусы (Coronaviridae), которые выбирают из группы: коронавирус человека 229E, коронавирус человека NL63, коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2. Универсальность вышеуказанного рекомбинантного вируса по изобретению, как средства для профилактики любого коронавируса из вышеуказанной группы, достигается за счет следующего.

В антигенных кассетах настоящего изобретения, используемых для индукции клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2, использовалось как минимум 102

фрагмента аминокислотных последовательностей, совпадающих у белков SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, зарегистрированных в базе данных IEDB ([iedb.org](http://iedb.org)) в качестве иммуногенных: GYQPYR VVVL, QPYR VVLSF, PYR VVLSF, LQDVVNQNAQALNTL, DVVNQNAQALNTLVKQL, AQALNTLVK, QALNTLVKQLSSNFGAI, ALNTLVKQL, LNTLVKQLSSNFGAI, SSNFGAISSVLNDIL, AISSVLNDILSRLDKVE, SVLNDILSR, VLNDILSRL, ILSRLDKVEAEVQIDRL, RLDKVEAEV, EAEVQIDRLITGRLQSL, AEVQIDRLIT, AEVQIDRLI, VQIDRLITGR, IDRLITGRLQSLQTY, RLITGRLQSLQTYVTQQ, LITGRLQSL, TGRLQSLQTYVTQQ, GRLQSLQTY, RLQSLQTYV, LQSLQTYVTQQ, SLQTYVTQQ, LIRAAEIR, LQTYVTQQ, LIRAAEI, QTYVTQQ, LIRAAEIR, APHG VVFLHV, GVVFLHVTY, VVFLHVTYV, EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY, EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY, RLNEVAKNL, EVAKNLNESLIDLQELG, NLNESLIDL, SLIDLQELGK, LIDLQELGKY, QELGKYEQYI, YEQYIKWPWY, WLGFIAGLIAIVMVT, LGFIAGLIAIVMVTI, FIAGLIAIV, GLIAIVMVTI, LSPRWYFY, SP, RWYFY, YL, ATEGALNTPK, ALNTPKDHI, VLQLPQGTTL, PKGFY, VLQLPQGTTL, LQLPQGTTL, QLPQGTTL, PKGFYAEGSR, QLPQGTTL, PKGFYAEGSRGGSQ, QLPQGTTL, PKGFYAE, QLPQGTTL, PK, LPQGTTL, PKG, GTTL, PK, GTTL, PKGFY, ALALLLDR, LALLLDR, LLLDRLN, Q, LLLDRLN, Q, LLLDRLN, Q, IRQGTDYKHW, PQIAQFA, QGTDYKHW, KHW, PQIAQFAPSASAFF, AQFAPSASAFFGMSR, AQFAPSASA, AQFAPSASAFFGMSRIGM, QFAPSASAFFGMSRIGM, APSASAFFGM, SASAFFGMSR, ASAFFGMSR, AFFGMSRIGMEVTPSGTW, FFGMSRIGMEVTPSGTW, GMSRIGMEV, MSRIGMEVTPSGTWL, GMEVTPSGTWL, MEVTPSGTWL, VTPSGTWLTY, TPSGTWLT, Y, ILLNKHID, ILLNKHIDA, LLNKHIDAYKTFPPTEPK, LNKHIDAYKTFPPTEPK, NKHIDAYKTFPPTEP, TFPPT, KTFPPTEPKK, KTFPPTEPK, TFPPT, EPK, FLWLLWPVT, FLWLLWPVTLACFVL, FLWLLWPVTL, LWLLWPVTL, WLLWPVTLA, LWPVTLACF, WPVTLACFVL, TLACFVLAA, TLACFVLA, AV, FVLA, AVYRI.

В ряде случаев эпитопы накладывались друг на друга с образованием более протяжённых иммуногенных областей (соответственно, также совпадающих у SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2): LQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQ, LIRAAEIR, EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWY, GYQPYR VVLSF, WLGFIAGLIAIVMVTI, IRQGTDYKHW, PQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTY, VLQLPQGTTL, PKGFYAEGSRGGSQ, ILLNKHIDAYKTFPPTEPKK, ALALLLDR, LNL, Q, ATEGALNTPKDHI, LSPRWYFY, YL, FLWLLWPVTLACFVLA, AVYRI.

В большинстве из этих регионов можно заметить консенсусные гидрофобные мотивы, характерных для антигенных пептидов, связываемых белками главного комплекса гистосовместимости (ГКГ; Major Histocompatibility Complex, МНС) разных классов, например FLWLLWPVTLACFVLAAYY, WLGFIAGLIAIVMTI, APHGVVFLHVITYY, FAPSASAFFGM, FGAISSVL, ALALLL (гидрофобные остатки выделены подчёркиванием). Из-за этой характерной особенности некоторые фрагменты коронавируса белков, содержащие наиболее универсальные мотивы, распознаются несколькими аллельными вариантами HLA. Например, эпитоп LSPRWYFYU связывается как минимум с семью аллельными формами HLA (<http://www.iedb.org/epitope/39576>). А для эпитопа FIAGLIAIV показано связывание со всеми вариантами HLA группы A2, в том числе с самым распространённым в мировой популяции HLA-A\*02:01 (<http://www.iedb.org/epitope/16156>).

Среди отобранных ранее последовательностей, используемых в данном изобретении, было найдено как минимум 10 антигенных фрагментов, обладающих значительной гомологией с последовательностями других пандемических и эпидемических штаммов коронавирусов, в том числе вызывающих сезонные ОРВИ (бета-коронавирусов HKU1 и OC43, альфа-коронавирусов 229E и NL63).

Большая часть консервативных участков, использованных в изобретении, относится к С-концевому региону гликопротеина S. Они обладают наибольшей иммуногенностью у здоровых людей из-за большей схожести с последовательностями коронавирусов, вызывающих сезонные ОРВИ: HKU1, OC43, 229E и NL63 [Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M. et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. Nature 587, 270–274 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>].

Так, фрагмент ILSRLDKVEAEVQIDRLITGRL гликопротеина S SARS-CoV-2 на 81.8% совпадает с аналогичным фрагментом бета-коронавирусов HKU1 и OC43, вызывающих острые респираторные инфекции человека; участок VVNQNAQALNTLVKQL – на 81.2%, а участок AEVQIDRLITGR – на 83.3%:

SARS-CoV-2

LQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDIILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTTQQ  
L

SARS-CoV-1

LQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDIILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTTQQ  
L

MERS

VQDAVNNNAQALSKLASELSNTFGAISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTLNAFVAQQ  
L

HKU1  
 IQSVVNANAQALNSLLQQLFNKFGAISSSLQEILSRLDNLEAQVQIDRLINGRLTALNAYVSQQ  
 L  
 OC43  
 IQAVVNANAEALNNLLQQLSNRFGAISASLQEILSRLDALEAEAQIDRLINGRLTALNAYVSQQ  
 L  
 229E  
 IQDVVNQQGNSLNHLTSQLRQNFQAISSSIQAIYDRLDTIQADQQVDRLITGRLAALNVFVSHT  
 L  
 NL63  
 IQDVVNQQGSALNHLTSQLRHNFQAISSSIQAIYDRLDSIQADQQVDRLITGRLAALNAFVSQV  
 L  
 :\* .\*\* :...\*. \* .:\* \* \*\*\* : \* .\*\*\* :: :  
 \*:\*\*\*\*\*.\*\*\* :\*:.:\*.: \*

Общая последовательность (948-1012 а.о. гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2) включает следующие использованные в изобретении фрагменты: ALNTLVKQL (IEDB ID: 2801), VLNDILSRL (IEDB ID: 69657), RLDKVEAEV (IEDB ID: 54507), LITGRLQSL (IEDB ID: 36724), RLQSLQTYV (IEDB ID: 54725).

Для всех перечисленных фрагментов описано связывание с наиболее распространённым в мировой популяции аллельным вариантом HLA-A\*02:01, для которого характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/143>).

Для эпитопов RLDKVEAEV, LITGRLQSL, RLQSLQTYV также описано связывание с аллельным вариантом HLA-A\*02:02 (а для LITGRLQSL – со всеми HLA группы A\*02), для которого характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/200>).

И наконец, для эпитопов RLDKVEAEV и RLQSLQTYV также описано связывание с аллельными вариантами HLA-A\*02:03, HLA-A\*02:06 и HLA-A\*68:02.

Для HLA-A\*02:03 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/201>).

Для HLA-A\*02:06 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/204>).

Для HLA-A\*68:02 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/231>).

Все ключевые остатки данных консенсусных последовательностей, выполняющих роль «гидрофобного якоря» для связывания с HLA (в девятом, втором и, в одном случае,

первом положении), обнаруживаются у всех соответствующих эпитопов (за исключением RLDKVEAEV) всех рассматриваемых коронавирусов (здесь и далее подчёркиванием выделены совпадающие с SARS-CoV-2 остатки, жирным шрифтом – ключевые остатки для связывания с HLA):

SARS-CoV-2	<u>ALNTLVKQL</u>	<u>VLNDILSRL</u>	<b><u>RLDKVEAEV</u></b>	<u>LITGRLQSL</u>
<u>RLQSLQTYV</u>				
SARS-CoV-1	<u>ALNTLVKQL</u>	<u>VLNDILSRL</u>	<b><u>RLDKVEAEV</u></b>	<u>LITGRLQSL</u>
<u>RLQSLQTYV</u>				
MERS	<u>ALSKLASEL</u>	<u>SIGDIIQRL</u>	<b><u>RLDVLEQDA</u></b>	<u>LINGRLTTL</u>
<u>RLTTLNAFV</u>				
HKU1	<u>ALNSLLQQL</u>	<u>SLQEILSRL</u>	<b><u>RLDNLEAQV</u></b>	<u>LINGRLTAL</u>
<u>RLTALNAYV</u>				
OC43	<u>ALNNLLQQL</u>	<u>SLQEILSRL</u>	<b><u>RLDALEAEA</u></b>	<u>LINGRLTAL</u>
<u>RLTALNAYV</u>				
229E	<u>SLNHLTSQL</u>	<u>SIQAIYDRL</u>		<u>LITGRLAAL</u> <b><u>RLAALNVFV</u></b>
NL63	<u>ALNHLTSQL</u>	<u>SIQAIYDRL</u>		<u>LITGRLAAL</u> <b><u>RLAALNAFV</u></b>
	:* . * .:*	: * .**	*** :*	: ** .*** :* **
:* .:*				

По данным IEDB, остальные аминокислотные вариации последовательностей разных штаммов либо не оказывают заметного влияния на связывание с соответствующим HLA, либо дополнительно усиливают взаимодействие с ним (например, для HLA-A\*02:01, замена четвертого остатка лизина в RLDKVEAEV у SARS-CoV-2 на остаток аспарагина у HKU1 и аланина у OC43; или замена седьмого остатка лизина в ALNTLVKQL у SARS-CoV-2 на остаток серина или глутамина у остальных штаммов). Подробные карты эффективности связывания для каждого остатка аминокислоты в каждом положении антигена размещены на сайте IEDB: HLA-A\*02:01 ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-02:01-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-02:01-9.html)), HLA-A\*02:02 ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-02:02-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-02:02-9.html)), HLA-A\*02:03 ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-02:03-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-02:03-9.html)), HLA-A\*02:06 ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-02:06-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-02:06-9.html)), HLA-A\*68:02 ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-68:02-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-68:02-9.html)).

Ещё одним консервативным С-концевым участком гликопротеина S, использованным в настоящем изобретении, является последовательность KNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWL (1191-1218 а.о. у SARS-CoV-2):

SARS-CoV-2	KNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWL
SARS-CoV-1	KNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWL
MERS	KALNESYIDLKELGNYTYYNKWPWYIWL
HKU1	KSLNSSFINLKEIGTYEMYVKWPWYIWL
OC43	KVLNQSYINLKDIGTYEYYVKWPWYVWL
229E	DNINSTLVDLKWLNRVETYIKWPWVWL

NL63            DQINSTYVDLKL<sup>LN</sup>RFENYIKWPWWVL  
                  . :\*.: :\*: :.            \* \* \* \* \* : \*\*

Этот участок в том числе включает использованные в изобретении фрагменты NLNESLIDL (IEDB ID: 44814) и YEQYIKWPWY (IEDB ID: 73751). Для NLNESLIDL описано связывание с HLA-A\*02:01 (консенсусную последовательность связываемого антигена см. выше), для YEQYIKWPWY – с HLA-B\*18:01, HLA-B\*40:01, HLA-B\*44:02, HLA-B\*44:03 и HLA-B\*45:01, но консенсусные последовательности антигена описаны только для HLA-B\*44:03 и HLA-B\*45:01.

Для HLA-B\*44:03 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/34>).

Для HLA-B\*45:01 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/36>).

Все ключевые остатки данных консенсусных последовательностей, выполняющих роль «гидрофобного якоря» для связывания с HLA, либо обнаруживаются у всех соответствующих эпитопов всех рассматриваемых коронавирусов (за исключением MERS), либо совпадают с таковыми у SARS-CoV-2:

SARS-CoV-2	<u>N</u> LNESLIDL	<u>Y</u> EQYIKWPWY
SARS-CoV-1	<u>N</u> LNESLIDL	<u>Y</u> EQYIKWPWY
MERS	<u>A</u> LNESYIDL	
HKU1	<u>S</u> LNSSF <sup>I</sup> NL	<u>Y</u> EMYVKWPWY
OC43	<u>V</u> LNQSY <sup>I</sup> NL	<u>Y</u> EYVVKWPWY
229E	<u>N</u> INSTLV <sup>D</sup> L	<u>V</u> E <sup>T</sup> YIKWPWW
NL63	<u>Q</u> INSTYVDL	<u>F</u> ENYIKWPWW
	:*.: :*: :	* * * * * :

По данным IEDB, остальные аминокислотные вариации последовательностей разных штаммов не оказывают заметного влияния на связывание с соответствующим HLA ([www.iedb.org/motif\\_output/HLA-A-02:01-9.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-A-02:01-9.html); [www.iedb.org/motif\\_output/HLA-B-44:03-10.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-B-44:03-10.html); [www.iedb.org/motif\\_output/HLA-B-45:01-10.html](http://www.iedb.org/motif_output/HLA-B-45:01-10.html)).

Также в С-концевом районе гликопротеина S расположены использованные в изобретении фрагменты APHG<sup>V</sup>VFLHVTYV (1056-1068 а.о. у SARS-CoV-2) и FIAGLIAIV (1220-1228 а.о. у SARS-CoV-2).

Для иммуногенных последовательностей VVFLHVTYV (IEDB ID: 71663) и FIAGLIAIV (IEDB ID: 16156) описано связывание с HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:02, HLA-A\*02:03, HLA-A\*02:06, HLA-A\*68:02 (консенсусные последовательности связываемых антигенов см. выше).

Оба фрагмента обладают низкой консервативностью среди большинства коронавирусов, но сохраняют гомологию с отдельными штаммами (VVFLHVTYV SARS-CoV-2 с последовательностью альфа-коронавируса 229E; FIAGLIAIV – с последовательностью MERS):

SARS-CoV-2	<u>VVFLHVTYV</u>	<u>FIAGLIAIV</u>
SARS-CoV-1	<u>VVFLHVTYV</u>	<u>FIAGLIAIV</u>
MERS		<u>FIAGLVALA</u>
229E	<u>VAFLPVEYV</u>	

По данным IEDB, незначительные аминокислотные вариации последовательностей разных штаммов не оказывают заметного влияния на связывание с соответствующим HLA (карты эффективности связывания антигенов см. выше).

Из использованных в изобретении последовательностей нуклеопротеина коронавируса SARS-CoV-2 наиболее консервативным является фрагмент 104-118 а.о. (LSPRWYFYLLGTGPE): совпадение с последовательностями бета-коронавирусов HKU1 и OC43 достигает 92.8%, с последовательностями MERS – 86.7%:

SARS-CoV-2	<u>LSPRWYFYLLGTGPE</u>
SARS-CoV-1	<u>LSPRWYFYLLGTGPE</u>
MERS	<u>LAPRWYFYLTGTGPE</u>
HKU1	<u>LLPRWYFYLLGTGPY</u>
OC43	<u>LLPRWYFYLLGTGPH</u>
229E	<u>LSPKLHFYLLGTGPH</u>
NL63	<u>LPPKVHFYLLGTGPH</u>
	* * : :*** *****

Общая последовательность в том числе включает в себя антигенный фрагмент SPRWYFYLL (IEDB ID: 60242), для которого описано связывание с HLA группы В: HLA-B\*07:02, HLA-B\*51:01, HLA-B\*53:01, HLA-B\*54:01. Консенсусные последовательности связываемого антигена описаны только для HLA-B\*07:02 и HLA-B\*51:01:

Для HLA-B\*07:02 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/251>).

Для HLA-B\*51:01 характерно взаимодействие с пептидами, которые имеют структуры, указанные в БД The Immune Epitope Database (IEDB) (<https://www.iedb.org/mhc/40>).

Ключевые остатки, выполняющие роль «гидрофобного якоря» для связывания с HLA (во втором и девятом положениях), остаются неизменными в последовательностях всех рассматриваемых коронавирусов (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, HKU1, OC43, 229E, NL63), а

остальные замены значительного влияния на связывание не оказывают, кроме остатка пролина в первом положении для NL63, затрудняющего связывание с HLA-B\*07:02 ([https://www.iedb.org/motif\\_output/HLA-B-07:02-9.html](https://www.iedb.org/motif_output/HLA-B-07:02-9.html); [https://www.iedb.org/motif\\_output/HLA-B-51:01-9.html](https://www.iedb.org/motif_output/HLA-B-51:01-9.html)):

SARS-CoV-2	<u>S</u> PRWYFYYL
SARS-CoV-1	<u>S</u> PRWYFYYL
HKU1	<u>L</u> PRWYFYYL
OC43	<u>L</u> PRWYFYYL
229E	<u>S</u> PKLHFYYL
NL63	<u>P</u> PKVHFYYL
	* : :***

Для некоторых из использованных в изобретении фрагментов (ALNTLVKQL, VLNDILSRL, FIAGLIAIV) показан высочайший уровень консервативности среди широкого спектра известных коронавирусов: до 100% гомологии у 21 штамма коронавирусов летучих мышей, панголинов и циветт [Prakash S, Srivastava R, Coulon PG, et al. Genome-Wide B Cell, CD4+, and CD8+ T Cell Epitopes That Are Highly Conserved between Human and Animal Coronaviruses, Identified from SARS-CoV-2 as Targets for Preemptive Pan-Coronavirus Vaccines. *J Immunol.* 2021;206(11):2566-2582. doi:10.4049/jimmunol.2001438. Supplementary 1], что позволяет рассчитывать на формирование клеток памяти против новых случаев зоонозных пандемий коронавирусов в будущем. На фигуре 19 представлено сравнение последовательностей фрагментов гликопротеина S различных коронавирусов и указан процент идентичности.

Точная оценка эффективности активации иммунной системы против широкого спектра коронавирусов затруднена оценкой схожести процессинга антигена для последовательностей белков разных коронавирусов из-за большого количества индивидуальных факторов, таких как разная вероятность образования иммунопротеасом с отличающейся протеолитической активностью в зависимости от интенсивности интерферонового ответа на вирус [Neefjes, J., Jongasma, M., Paul, P. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823–836 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri3084>] [Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell.* 2010;142(4):613-624. doi:10.1016/j.cell.2010.07.036], а также слабой изученностью данного вопроса. Тем не менее, в большинстве случаев последовательности, фланкирующие ключевые иммуногенные фрагменты коронавирусов, использованных в данном изобретении, также крайне схожи между собой.



Таким образом, использование вакцины, содержащей антигенные кассеты настоящего изобретения, может сформировать устойчивый клеточный иммунитет к SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1 в равной степени, а также на все известные на момент публикации изобретения региональные варианты SARS-CoV-2, включая «британский» штамм SARS-CoV-2 B.1.1.7, «бразильский» штамм SARS-CoV-2 P.1, «южноафриканский» штамм SARS-CoV-2 B.1.351 и «индийский» штамм SARS-CoV-2 B.1.617.2 (варианты). Например, известно, что у более чем 70% переболевших COVID-19 обнаруживаются активированные Т-лимфоциты, распознающие эпитоп RLQSLQTYV [Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, et al. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors. *Immunity*. 2020;53(6):1245-1257.e5. doi:10.1016/j.immuni.2020.11.004] [Liao, M., Liu, Y., Yuan, J. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* 26, 842–844 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>], входящий в состав антигенных кассет настоящего изобретения.

Помимо этого, для всех вышеописанных антигенных фрагментов, использованных в настоящем изобретении, не только показана высокая степень схожести с аналогичными фрагментами других штаммов семейства коронавирусов во взаимодействии с HLA разных групп, но и экспериментально подтверждена индукция Т-клеточного иммунитета с последующей активацией интерферонового ответа, что даёт основания предполагать возможность формирования клеточного иммунитета также против потенциально пандемического штамма MERS и штаммов, вызывающих сезонные ОРВИ (бета-коронавирусов HKU1 и OC43, альфа-коронавирусов 229E и NL63).

Вышеуказанные расчеты подтверждаются последними научными публикациями в ведущих научных журналах. Например, в статье [Katja G. Schmidt et al., SARS-CoV-2-Seronegative Subjects Target CTL Epitopes in the SARS-CoV-2 Nucleoprotein Cross-Reactive to Common Cold Coronaviruses; *Front Immunol*. 2021; 12: 627568; doi: 10.3389/fimmu.2021.627568] показан кросс-реактивный клеточный иммунный ответ на SARS-CoV-2 и бета-коронавирусы, вызывающие ОРВИ человека: OC43 и HKU1. В частности, подавляющее большинство Т-лимфоцитов, распознающих эпитопы из фрагмента DLSRWYFYFL SARS-CoV-2, использованного в изобретении, показывало выраженный интерфероновый ответ и на пептид QLLSPRWYFYFL из белков OC43 и HKU1. Также, в статье [Kevin O. Saunders ET ALL., Neutralizing antibody vaccine for pandemic and pre-emergent coronaviruses, *Nature*, 2021, 1-24, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03594-0>] описываются антитела от универсальной вакцины, которые успешно нейтрализовали четыре разных коронавируса. В данной статье указано, что проверка новой вакцины на наночастицах на макаках показала, что выработанные после вакцинации

антитела могут эффективно нейтрализовать не только SARS-CoV-2, но и два близких коронавируса летучих мышей и SARS-1. Авторы данной статьи считают, что такая вакцина может защищать не только от SARS-CoV-2, но и от других потенциальных инфекций, которые могут перейти к человеку от животных, так как во всех случаях антитела нейтрализовывали не только SARS-CoV-2 (включая "британский" вариант В.1.1.7, "южноафриканский" В.1.351 и "бразильский" Р.1), но и SARS-CoV-1 и два коронавируса летучих мышей.

### **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.

### **Общее описание сборки и клонирования генетических конструкций, несущих рекомбинантные сегменты генома вакцинного штамма вируса гриппа на основе аттенуированного штамма A/Leningrad/134/17/57, кодирующих относящиеся к изобретению антигенные кассеты.**

Все использованные в изобретении нуклеотидные последовательности, кодирующие те или иные иммуногенные фрагменты белков вируса SARS-CoV-2, а также различные служебные регуляторные последовательности, такие как сигнальные пептиды, линкеры, функциональные домены других белков, саморасщепляемые пептиды и т.д., были получены путём сборки *de novo* из отдельных олигонуклеотидных фрагментов длиной порядка 100 нуклеотидов, путём их ренатурации друг на друге с последующей ПЦР-амплификацией с крайних праймеров. Для оптимизации процесса сборки и стабильности итоговой вторичной структуры использовалось программное обеспечение, разработанное ЗАО «Биокад». В процессе синтеза последовательностей трансгенов к 5'- и 3'-концам молекулы были добавлены необходимые сайты рестрикции SapI или перекрытия (участки последовательности, одинаковые для вставки и вектора) длиной 20-40 нуклеотидов для дальнейшего молекулярного клонирования безлигазными методами (SLIC, метод Гибсона).

Полученные синтетические последовательности вносились в вектор для обратной генетики вируса гриппа rCIPolISapIT, содержащий последовательности того или иного сегмента генома вируса гриппа, различными методами:

1. Клонированием с помощью рестрикции и лигирования.
2. Методом одностадийного молекулярного клонирования с использованием T4 полимеразы SLIC (sequence and ligase independent cloning), описанным повсеместно, в том

числе в «Sambrook J. et al. Molecular cloning: A laboratory manual», и оптимизированным в ЗАО «Биокад».

3. Методом Гибсона.

Последовательности ДНК клонированных фрагментов подтверждали путем секвенирования векторов по методу Сэнгера.

В качестве стоп-кодонов для терминации трансляции антигенной кассеты использовалась одна из следующих последовательностей: ТААТГАТАА, ТАААТГАТТАА.

При использовании описанных рекомбинантных плазмид изобретения достигается выраженная индукция обеих ветвей иммунного ответа при сохранении функциональности вектора, в первую очередь его способности реплицироваться и многократно представлять целевые антигены SARS-CoV-2 иммунной системе.

Схемы генетических конструкций были получены с помощью программного обеспечения SnapGene и SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com>).

**Пример 1. Сборка генетических конструкций, несущих рекомбинантный шестой сегмент генома штамма вируса гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9), кодирующих модифицированный ген NA и антигенные кассеты.**

Нуклеотидные последовательности по данному изобретению, кодирующие полиэпитопные антигенные кассеты, состоящие из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2, описанные в соответствующем разделе подробного описания изобретения (конкретные варианты указаны в SEQ ID NO: 59-94), используемые для индукции клеточного иммунного ответа, были получены описанным выше путём синтеза *de novo*. В процессе синтеза последовательностей трансгенов к 5'- и 3'-концам молекулы были добавлены необходимые сайты рестрикции SapI.

Полученные последовательности были внесены методом рестрикции и лигирования, описанным выше, в универсальный вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT\_NA-AnhuiN9, содержащий последовательности шестого сегмента генома вируса гриппа, в том числе ген NA (N9), кодирующий нейраминидазу девятого типа штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9), после последнего 3'-концевого кодона белок-кодирующей части гена (сгс) с сохранением открытой рамки считывания для совместной трансляции с белками модифицированного вируса гриппа, перед защитной 3'-нетранслируемой областью из 157 нуклеотидов (фигура 1).

Таким образом, при трансляции образуется полноразмерная нейраминидаза, отделяющаяся от гибридной полипептидной цепи за счёт саморасщепляемого пептида P2A, что позволяет ей выполнять свои функции в полном объёме, а также антигенная кассета, содержащая несколько целевых эпитопов SARS-CoV-2, в дальнейшем расщепляемая в протеосомах клетки на заданные эпитопы, которые затем презентуются на поверхности клетки в комплексе с белками ГКГ I класса.

Итоговые генетические конструкции имеют размер от 6333 до 6577 п.н. и отличаются только уникальными последовательностями трансгенов, указанными выше, а в остальном полностью идентичны. В качестве примера на фигуре 2 приведена карта вектора общим размером 6577 п.н., кодирующего в качестве трансгена вставку размером 597 п.н.

Конечный вектор содержит все необходимые элементы для экспрессии нативных генов вируса гриппа и целевых трансгенов, а также сборки и заданного функционирования рекомбинантного вакцинного штамма.

**Пример 2. Сборка генетических конструкций, несущих рекомбинантный восьмой сегмент генома аттенуированного штамма вируса гриппа A/Leningrad/134/17/57, кодирующих модифицированный ген NS и антигенные кассеты.**

Нуклеотидные последовательности данного изобретения, кодирующие рецептор-связывающий домен (RBD) белка Spike коронавируса SARS-CoV-2, его производные или полиэпитопные антигенные кассеты, состоящие из комбинаций фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2, описанные в соответствующих пунктах подробного описания изобретения (конкретные варианты указаны в SEQ ID NO: 59-94), используемые для индукции иммунного ответа, были получены описанным выше путём синтеза *de novo*. В процессе синтеза последовательностей трансгенов к 5'- и 3'-концам молекулы были добавлены необходимые перекрытия (участки последовательности, одинаковые для вставки и вектора) длиной 30-40 нуклеотидов для дальнейшего молекулярного клонирования безлигазными методами.

Полученные последовательности были внесены методом Гибсона, описанным выше, в универсальный вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT\_NS-Len17, содержащий последовательность восьмого сегмента генома вируса гриппа, в том числе модифицированного гена NS от донора аттенуации A/Leningrad/134/17/57.

С учётом сложного строения и регуляции альтернативного сплайсинга гена NS, а также важности белков NS1 и NS2 (NEP) для полноценного функционирования вируса гриппа, при данном клонировании может быть использована следующая схема:

Целевые последовательности встраиваются в первую рамку считывания, на 3'-конце от 126-го кодона кодирующей белок NS1 части (aag), при этом не меняя регуляторные последовательности гена NS, управляющие его сплайсингом (фигура 3).

В любом случае, при трансляции образуется три отдельных полипептидных цепи: укороченная версия белка NS1 (1-126 а.о.), полноценно выполняющая необходимые функции для поддержания репликативной активности рекомбинантного вируса гриппа, составляющего основу изобретения; полноразмерный белок NS2; а также последовательность целевой вставки, кодирующая комбинацию фрагментов белков гликопротеина S (или Spike) (SEQ ID NO: 1), нуклеопротеина (или Nucleoprotein) (SEQ ID NO: 3), и, при необходимости, мембранного белка (или Membrane) (SEQ ID NO: 5) бета-коронавируса SARS-CoV-2.

Активация иммунной системы при использовании описанных рекомбинантных плазмид изобретения достигается разными способами, в зависимости от используемых регуляторных элементов и функциональных доменов, описанных в разделе «Подробное описание изобретения», и в том числе включает: презентацию иммуногенных эпитопов на мембране заражаемых клеток в комплексе с белками ГКГ обоих классов.

Итоговые генетические конструкции имеют размер от 5656 до 6286 п.н. и в пределах одной схемы клонирования отличаются только уникальными последовательностями трансгенов, указанными выше, а в остальном полностью идентичны. В качестве примеров приведена карта вектора общим размером 5899 п.н., созданная по вышеуказанной схеме клонирования соответственно; кодирующая в качестве трансгена вставку размером 597 (фигура 4).

Конечные вектора содержат все необходимые элементы для экспрессии нативных генов вируса гриппа и целевых трансгенов, а также сборки и заданного функционирования рекомбинантного вакцинного штамма.

### **Пример 3. Сборка вакцинных кандидатов на основе аттенуированного вируса гриппа.**

Рекомбинантные вирусы гриппа, несущие в своем геноме иммуногенные участки нового коронавируса SARS-CoV-2, получали на основе обратно-генетической системы, разработанной для донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (Isakova-Sivak, I. ET AL., "Characterization of reverse genetics-derived cold-adapted master donor virus

A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and reassortants with H5N1 surface genes in a mouse model.", 2014, Clin Vaccine Immunol 21(5): 722-731 и Isakova-Sivak, I. ET AL., "Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).", 2011, Virology 412(2): 297-305). Вакцинные кандидаты получали методом электропорации сертифицированной линии клеток Vero (WHO). В данном примере показано получение жизнеспособных рекомбинантных вирусов гриппа, несущих различные полиэпитопные кассеты коронавируса, закодированных в одном из трех генов вируса гриппа.

В опытах использовались следующие материалы:

- Плазмиды (вектор для обратной генетики вируса гриппа), со вставкой, кодирующей гены донора аттенуации живой гриппозной вакцины A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (таблица 1).

**Таблица 1**

<b>Ген</b>	<b>Плазмида</b>
<b>PB2</b>	pCIPolISapIT_Len_PB2
<b>PB1</b>	pCIPolISapIT_Len_PB1
<b>PA</b>	pCIPolISapIT_Len_PA
<b>NP</b>	pCIPolISapIT_Len_NP
<b>M</b>	pCIPolISapIT_Len_M
<b>NS</b>	pCIPolISapIT_Len_NS

- Плазмиды, кодирующие гены вируса гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9) (таблица 2).

**Таблица 2**

<b>Ген</b>	<b>Плазмида</b>
<b>HA</b>	pCIPolISapIT_Anhui_HA
<b>NA</b>	pCIPolISapIT_Anhui_NA

- Плазмиды, кодирующие гены вируса гриппа A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1) (таблица 3).

**Таблица 3**

<b>Ген</b>	<b>Плазмида</b>
<b>HA</b>	pCIPolISapIT_GDM_HA
<b>NA</b>	pCIPolISapIT_GDM_NA

- Плазмиды, кодирующие модифицированные гены вируса гриппа A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) (таблица 4).

**Таблица 4**

<b>Ген</b>	<b>Вставка</b>	<b>Плазмида</b>
NS	Кассета 1	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#1_CTL_MNSSS
NS	Кассета 2	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#2-orig_CTL-CD4-BL_SN
NS	Кассета 3	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#3-reverse_CTL-CD4-BL_NS
NS	Кассета 4	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette_4_CTL-BL_SSMNS
NS	Кассета 6	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette_6_CTL_SSMNS
NS	Кассета 7	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette_7_CTL_SSNSM
NS	Кассета 9	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#9_CTL-BL_MSSNS
NS	Кассета 10	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#10_CTL-BL_NNNSS
NS	Кассета 14	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#14_CTL-CD4-BL_NNSNN
NS	Кассета 15	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#15_CTL-CD4-BL_15_NNSSS
NS	Кассета 18	pCIPolISapIT_NS-126-Len17_cassette#18

- Плазмиды, кодирующие модифицированные гены вируса гриппа A/Anhui/01/2013 (H7N9) (таблица 5).



**Таблица 5**

<b>Ген</b>	<b>Вставка</b>	<b>Плазмида</b>
NA	Кассета 1	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#1_CTL_MNSSS
NA	Кассета 2	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#2-orig_CTL-CD4-BL_SN
NA	Кассета 3	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#3-reverse_CTL-CD4-BL_NS
NA	Кассета 5	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#5
NA	Кассета 8	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#8
NA	Кассета 15	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#15
NA	Кассета 16	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#16_CTL-CD4-BL_NNNSS
NA	Кассета 17	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#17_CTL-BL_17_NNNSSSS
NA	Кассета 18	pCIPolISapIT_NA-AnhuiN9_cassette#18_CTL-CD4-BL_18_NNNSSSS

- Клеточная линия Vero
- Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток
- Реагент для диссоциации клеток Раствор антибиотика-антимикотика
- Добавка для роста клеток
- Трипсин
- Флакон для адгезионных клеточных культур
- Фосфатно-солевой раствор Дальбекко
- 6-луночный планшет для культур клеток
- Этанол 70%
- Трис-ЭДТА буфер
- Натрий-ацетатный буфер, содержащий 3 М NaOAc (pH 4.8). Для приготовления буфера смешать 95 мл 100% этанола с 4 мл 3 М NaOAc (pH 4.8) и 1 мл стерильной воды. Перемешать переворачиванием флакона и хранить на -20. Для подготовки 10 мл 3 М NaOAc раствора растворить 4.08 г NaOAc\*3H<sub>2</sub>O в 8.38 мл H<sub>2</sub>O до полного растворения

- Система трансфекции
- Набор реагентов для проведения процедуры электропорации
- 10-11-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (SPF)
- Планшеты 96-луночные круглодонные для иммунологических реакций
- Фильтр с размером пор 0,2 мкм

**Подготовка клеточной линии Vero.** Клеточную линию Vero выводили из криохранилища заблаговременно. Для этого клетки, извлеченные из криохранилища, отмывали от диметилсульфоксида в 10 мл разогретой **среды А**, центрифугировали при 1500 rpm 20°C в течение 15 минут, затем вносили осадок клеток во флакон для культивирования T-75 и добавляли среду А для культивирования, клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После достижения клеточным монослоем конfluenceности 95-100% приступали к выполнению дальнейшего протокола.

**Подготовка клеток Vero к трансфекции.** Готовили **среду В**, без добавления антибиотика, среду фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Среду А удаляли из флакона с клетками, дважды отмывали флакон теплым раствором DPBS и снимали клетки с субстрата аккутазой (1 мл на флакон T-75), для этого в течение 1 минуты инкубировали флакон при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. 3/4 клеток переносили в новый N150 флакон (Nunc), добавляли 100 мл среды В, инкубировали в течение 16-18 часов при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе.

На следующий день клетки снимали с субстрата аккутазой, следуя тому же протоколу. Добавляли 10 мл разогретой до 37°C среды В, переносили клетки в среде в стерильную пробирку и центрифугировали 15 минут 1500 rpm при 20°C.

**Подготовка плазмид для получения вируса гриппа (сборка и концентрирование).** Накануне трансфекции плазмиды, кодирующие 8 генов вируса гриппа, смешивали в 1 пробирке типа эппендорф, из расчета 2 мкг каждой плазмиды, далее добавляли 120 мкл натрий-ацетатного буфера (в случае низкой концентрации плазмид – объем буфера из расчета 2,5 объема раствора пДНК). Перемешивали на вортексе в течение 5 секунд, после чего инкубировали на -20 в течение 16-18 часов, далее приступали к протоколу концентрирования.

Для концентрирования эппендорфы с плазмидами центрифугировали при 4°C, 13.2×10<sup>3</sup> rpm 15 минут, немедленно после центрифугирования полностью отбирали супернатант, не задевая осадок. При отсутствии осадка протокол прерывали и начинали заново с момента сборки плазмид.

В пробирки добавляли по 120 мкл 70% этанола, аккуратно воздействуя на осадок, чтобы отмыть его от стенки пробирки, при этом не ресуспендировали пипеткой. Далее

центрифугировали при 4°C,  $13.2 \times 10^3$  rpm 5 минут, после чего полностью отбিরали супернатант, не задевая осадок. Далее подсушивали осадок при комнатной температуре в течение 15 минут в пробирках с открытыми крышками для удаления остатков этанола.

Осадок ресуспендировали в 8 мкл ТЕ-буфера и приступали к протоколу трансфекции.

#### **Трансфекция клеток Vero плазмидами, кодирующими 8 генов вируса гриппа.**

Перед проведением трансфекции дозатор, кюветы Neon, аппарат для проведения электропорации помещали в ламинар и облучали УФ для обеспечения стерильности манипуляций. В 6-луночный планшет для культивирования клеток добавляли по 3 мл разогретой среды В. В кювету Neon для трансфекции наливали 3 мл буфера E2 и помещали в аппарат для проведения электропорации (Neon Pipette Station). После центрифугирования клеток удаляли среду В и аккуратно ресуспендировали клетки в буфере R из расчета 110 мкл суспензии на 1 вирус.

110 мкл суспензии клеток Vero в буфере R добавляли в эппендорф с плазмидной ДНК (8 мкл). Аккуратно перемешивали суспензию клеток с раствором плазмид, используя дозатор Neon с одноразовым наконечником для проведения трансфекции, далее набирали суспензию в наконечник и помещали дозатор Neon в аппарат для электропорации с подготовленной кюветой. Проводили электропорацию по протоколу 1150 V, 20ms, 2 импульса. Далее суспензию раскапывали по подготовленной культуральной чашке (лунке планшета) со средой В.

После проведения электропорации, планшет помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор на 37°C на 6 часов для прикрепления клеток, спустя 6 часов удаляли среду В, дважды отмывали клетки теплым раствором DPBS и добавляли по 3 мл **среды С**, далее планшет инкубировали при 33 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 64-72 часов.

**Заражение развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) материалом после трансфекции.** Трансфецированные клетки Vero снимали с планшета с помощью скрепера для клеток. Клетки ресуспендировали в среде. 10-11-дневные куриные эмбрионы заражали неразведенной средой с трансфецированными клетками в объеме 0,2 мл/эмбрион по стандартной методике. Остатки трансфецированных клеток в питательной среде переносили в виалу и хранили на -70 °C. Эмбрионы инкубировали при температуре 33°C в термостате.

**Детекция вируса в реакции гемагглютинации.** Спустя 72 часа эмбрионы охлаждали в течение 3 часов при температуре +4°C и вскрывали скорлупу для отбирания хориоаллантаической жидкости (ХАЖ). В 7 рядов 96-луночного круглодонного планшета для иммунологических реакций вносили по 50 мкл PBS, в верхний ряд по 100 мкл ХАЖ из

каждого эмбриона. Титровали по 50 мкл двукратными разведениями в 7 рядах, после чего добавляли в каждую лунку планшета по 50 мкл суспензии 1% куриных эритроцитов. Наличие вируса фиксировали через 20-30 минут по наличию агглютинации эритроцитов в лунках. Титр вируса по гемагглютинации определяли по последнему разведению вируса, в котором наблюдалась агглютинация эритроцитов.

**Слепой пассаж.** В случае, если ни в одной лунке не наблюдалась агглютинация эритроцитов, по 0,3 мл ХАЖ из каждого эмбриона пассажа Е1 шприцом переносилась в новый эмбрион для возможного накопления вируса при недостаточном для детекции количестве. Эмбрионы инкубировали в течение 72 часов при температуре 33°C. Всего после каждой трансфекции предпринималось до 3 последовательных слепых пассажей.

**Накопление и клонирование вируса в РКЭ.** В случае, если агглютинация эритроцитов была детектирована, ХАЖ собирали, осветляли низкоскоростным центрифугированием (3000 rpm, 15 мин), аликвотили в виалы по 1 мл и хранили на -70 °С. Далее производилось клонирование вируса в РКЭ методом предельных разведений, из отдельных клонов стерильно собирали ХАЖ в отдельные виалы. Далее на основе одного из клонов, не содержащего мутаций, копили рабочий сток вируса методом титрования в РКЭ.

**Контроль сборки вируса методом ПЦР и секвенирования.** Для контроля сборки вируса в первом пассаже, в котором было обнаружено наличие вируса методом гемагглютинации, из 140 мкл ХАЖ выделяли РНК для проверки наличия у вируса специфической вставки в ген (гены) методом ПЦР со специфическими праймерами. Анализ отдельных клонов производился методом ПЦР с последующим сэнгеровским секвенированием последовательности гена, содержащего вставку. Рабочий сток также анализировали методом секвенирования.

В таблице 6 приведен список вакцинных кандидатов, сборка которых производилась, с датами трансфекции и данными о результате сборки. В последнем столбце таблицы приведены данные о дате получения рабочего стока, а также данные о тех кандидатах, работа с которыми была прекращена на раннем этапе по различным причинам.

**Таблица 6.** Результаты сборки вакцинных кандидатов.

Вакцинный кандидат	Гены вируса
--------------------	-------------

	<b>PB2, PB1, PA, NP, M</b>	<b>HA</b>	<b>NA</b>	<b>NS</b>
CoVac-1	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+кaccera 1
CoVac-2	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кaccera 2
CoVac-3	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кaccera 3
CoVac-4	Len17	H1- Guangdong- Maonan	N1- Guangdong- Maonan	NS126Len17+ кaccera 1
CoVac-5	Len17	H1- Guangdong- Maonan	N1- Guangdong- Maonan	NS126Len17+ кaccera 2
CoVac-6	Len17	H1- Guangdong- Maonan	N1- Guangdong- Maonan	NS126Len17+ кaccera 3
CoVac-7	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 1	Len17
CoVac-8	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 2	Len17
CoVac-9	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 3	Len17
CoVac-10	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 1	NS126Len17+ кaccera 2
CoVac-11	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 1	NS126Len17+ кaccera 3
CoVac-12	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кaccera 3	NS126Len17+ кaccera 1
CoVac-13	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кaccera 6

CoVac-14	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 7
CoVac-15	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 9
CoVac-16	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 4	Len17
CoVac-17	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 5	Len17
CoVac-18	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 8	Len17
CoVac-25	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 4	NS126Len17+ кассета 6
CoVac-26	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 16	Len17
CoVac-27	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 17	Len17
CoVac-28	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 18	Len17
CoVac-29	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 10
CoVac-30	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 15
CoVac-31	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 16
CoVac-32	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 17
CoVac-33	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui	NS126Len17+ кассета 18
CoVac-42	Len17	H7-Anhui	N9-Anhui+ кассета 18	Len17

С использованием указанного дизайна конструкций сборки химерных вирусов гриппа прошла успешно. Кассеты данного размера, встроенные в данные участки генов вируса гриппа, не мешают сборке жизнеспособного вируса гриппа.

#### **Пример 4. Индукция гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа при интраназальной иммунизации мышей**

Вакцинные вирусы накапливали в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Инфекционную активность вирусов определяли в РКЭ методом предельных разведений, вычисляли по методу Reed&Muench и выражали в 50%-ных эмбриональных инфекционных дозах (ЭИД<sub>50</sub>). Оценку иммуногенных свойств вакцинных кандидатов ЖГВ H7N9, несущих полиэпитопные Т-клеточные кассеты от вируса SARS-CoV-2, в отношении вируса гриппа проводили в экспериментах на трансгенных мышах линии HLA-A2.1 RANDOM TRANSGENIC (Taconic, США). Проводили два независимых эксперимента с вакцинными вирусами, указанными в Таблице 7. В первом опыте изучалась иммуногенность четырех рекомбинантных вирусов гриппа со вставками фрагментов SARS-CoV-2, в сравнении с векторным контролем – штаммом ЖГВ H7N9 [PMID: 30903496]. Отрицательным контролем служили мыши, получившие препарат плацебо (физиологический раствор, PBS). Во втором эксперименте изучалась иммуногенность одного рекомбинантного штамма в сравнении с векторным контролем группой плацебо. В каждую группу входило 6 мышей в возрасте 6-10 недель. Животных иммунизировали интраназально вакцинными вирусами в дозе 10<sup>6</sup> ЭИД<sub>50</sub>, двукратно, с интервалом 21 день, в объеме 50 мкл/мышь под легкой ингаляционной анестезией препаратом изофлюран.

Сыворотки крови мышей собирали через 10 дней после второй иммунизации и оценивали уровни антител к гриппу в иммуноферментном анализе (ИФА). В качестве антигена в ИФА использовали цельный вирус гриппа ЖГВ H7N9, очищенный на градиенте плотности сахарозы, в концентрации 50 нг/лунку. Планшеты с антигеном трижды промывали раствором PBS с 0.05% Tween 20 (PBS-T), после чего проводили блокировку неспецифического связывания 1%-ным раствором BSA на PBS. Двукратные разведения сывороток на PBS вносили в лунки планшетов в объеме 50 мкл, начиная с разведения 1:100. После инкубации 1 час при 37°C планшеты промывали 3 раза PBS-T, вносили 50 мкл вторичных антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich A9044, США), разведенных 1:10000. После 30-минутной инкубации планшеты промывали 4 раза раствором PBS-T, просушивали и добавляли 50 мкл субстрата TMB (1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution, Thermo, США). Планшеты инкубировали в темном месте в течение 5-10 мин, затем реакцию останавливали 25 мкл 1M серной кислоты. Результаты считывали на спектрофотометре xMark Microplate (BIORAD) при длине волны 450 нм. В результате эксперимента определяли уровни вырабатываемых IgG антител по

параметру «площадь под кривой» оптической плотности (Area Under the Curve, AUC), который вычисляли по правилу трапеций отдельно для каждой сыворотки. Визуализацию полученных результатов и статистическую обработку проводили с помощью GraphPad Prism 5. Статистическую разницу между группами определяли методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки.

На фигурах 5-8 приведены результаты оценки уровней IgG антител к цельному вирусу гриппа. Все вакцинные варианты индуцировали высокие уровни анти-Н7N9 IgG антител, достоверно отличаясь от контрольной группы PBS ( $p < 0.0001$ ). Кроме того, рекомбинантные вирусы, содержащие полиэпитопные кассеты от вируса SARS-CoV-2, были более иммуногенны по сравнению с контрольным вакцинным штаммом ЖГВ Н7N9, использованным в качестве вирусного вектора. Эти данные указывают на усиление иммуногенных свойств живой гриппозной вакцины в отношении вируса гриппа при встраивании в геном вакцинного штамма полиэпитопных Т-клеточных кассет нового коронавируса, при этом независимо от того, какой из участков генома вируса гриппа был модифицирован (ген NA или ген NS1).

**Таблица 7.** Рекомбинантные вакцинные штаммы вируса гриппа, изученные на мышах

Условное обозначение штамма	Описание вакцинного штамма
<i>Эксперимент №1</i>	
CoVac-13	Реассортантный штамм 6:2 подтипа Н7N9 со вставкой кассеты 6 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-16	Реассортантный штамм 6:2 подтипа Н7N9 со вставкой кассеты 4 в гене N9-NA
CoVac-17	Реассортантный штамм 6:2 подтипа Н7N9 со вставкой кассеты 5 в гене N9-NA
CoVac-18	Реассортантный штамм 6:2 подтипа Н7N9 со вставкой кассеты 8 в гене N9-NA
ЖГВ Н7N9	Штамм живой гриппозной вакцины А/17/Ануи/2013/62 (Н7N9), полученный методами обратной генетики [PMID: 30903496]
<i>Эксперимент №2</i>	



CoVac-27	Реассортантный штамм б:2 подтипа Н7N9 со вставкой кассеты 17 в гене N9-NA
ЖГВ Н7N9	Штамм живой гриппозной вакцины А/17/Ануи/2013/62 (Н7N9), полученный методами обратной генетики [PMID: 30903496]

**Пример 5. Оценка уровней вирус-специфических Т-клеток памяти в *in vitro* тесте на мононуклеарах периферической крови добровольцев, перенесших COVID-19 в естественных условиях.**

Данный эксперимент предназначен для подтверждения правильного процессинга встроенных в геном вакцинного вируса гриппа полиэпитопных Т-клеточных кассет SARS-CoV-2 иммунными клетками человека. Поскольку у COVID-19 реконвалесцентов присутствует пул Т-клеток памяти к различным эпитопам нового коронавируса, инкубация *in vitro* РВМС этих доноров с вакцинными кандидатами может дать представление о способности рекомбинантных вирусов экспрессировать встроенные Т-клеточные эпитопы и, соответственно, стимулировать пролиферацию SARS-CoV-2-специфических Т-клеток. Обязательным условием постановки эксперимента является параллельная стимуляция мононуклеарных клеток исследуемым рекомбинантным вирусом и классическим штаммом ЖГВ, использованным в качестве вирусного вектора. Разница в уровнях субпопуляций Т-клеток после такой стимуляции позволит судить об активации Т-клеток к встроенным Т-клеточным эпитопам коронавируса. Было проведено два независимых эксперимента с рекомбинантными вирусами гриппа и векторным контролем (Таблица 8). Вирусы были накоплены в РКЭ и очищены на градиенте плотности сахарозы для очистки вирусосодержащей жидкости от куриных белков. Инфекционный титр очищенного вируса гриппа определяли в РКЭ десятикратными разведениями вируса в 3-5 повторах по методике Reed & Meunch [1938] и выражали в 50% эмбриональных инфекционных дозах на мл (ЭИД<sub>50</sub>/мл).

В эксперименте 1 участвовало 13 добровольцев, в эксперименте 2 – 17 добровольцев. Демографические данные участников приведены в Таблице 9. Наличие COVID-19 в анамнезе было подтверждено положительным тестом на вирусную РНК в мазках (метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени) и/или наличием SARS-CoV-2-специфических IgG антител в сыворотках крови (метод ИФА к белку RBD SARS-CoV-2). Эксперимент был одобрен на заседании Локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» (выписка из протокола заседания ЛЭК №2/20 от 07.04.2020 г.), и все добровольцы подписали информированное согласие на проведение исследования. Кроме того, в качестве отрицательного контроля использовались образцы РВМС от добровольцев, никогда не

контактировавших с вирусом SARS-CoV-2 (подтвержденное отсутствие антител к коронавирусу в ИФА).

Для получения культуры PBMC цельную кровь COVID-19 реконвалесцентов забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА, затем смешивали с раствором Хенкса в соотношении 1:1 и выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности фиколла. Выделенную фракцию мононуклеарных клеток ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей антибиотик-антимикотик, 10 mM HEPES,  $\beta$ -меркаптоэтанол и 20 U Ронколейкина, и полученную суспензию в концентрации  $4 \times 10^7$  кл/мл использовали для стимуляции исследуемыми вирусами (50 мкл/лунку клеточной взвеси или  $2 \times 10^6$  клеток на пробу). Для стимуляции клеток использовали очищенные вирусы гриппа, а также форбол и иономицин в качестве положительного контроля. Вакцинные кандидаты добавляли в лунки планшета с лимфоцитами в объеме 50 мкл с множественностью заражения 3 (количество инфекционных единиц на клетку), после чего клетки инкубировали в среде, содержащей 30% эмбриональной бычьей сыворотки, в течение 16-18 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Внутриклеточное окрашивание цитокинов, индуцированных антигенной стимуляцией, проводили в несколько этапов: остановка белкового транспорта клетки, покраска поверхностных антигенов, фиксация и пермеабиллизация клеток, покраска внутриклеточных антигенов – цитокинов. Для остановки белкового транспорта использовали Брефельдин А в разведении 1:1000, после чего клетки инкубировали дополнительно 5 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> и далее проводили окрашивание поверхностных антигенов антителами к маркерам CD4, CD8, CD3, CD45RA, CCR7, а также реагентом Zombie Aqua для выявления живых клеток. Для проведения фиксации и пермеабиллизации клеток добавляли использовали Fix/Perm буфер, и далее фиксированные и пермеабиллизированные клетки окрашивали антицитокиновыми антителами к IFN- $\gamma$ . После отмывки окрашенных клеток PermWash-буфером клетки фиксировали в CytoLast буфере и хранили в темноте при 4°C до анализа на проточном цитометре. Исследование образцов проводили на проточном цитометре Navios flow cytometer (Beckman Coulter). Обработку FACS-файлов производили в пакетах программ FlowJo software. Данные по %-ному содержанию вирус-специфических Т клеток памяти получали путем вычитания пропорции клеток со спонтанной интерферонопродукцией (нестимулированные МПК) из уровней Т клеток, выявляемых при стимуляции клеток соответствующим вирусом. Статистическую обработку результатов проводили в программном обеспечении GraphPad Prizm 7.0 методом непараметрического анализа с использованием Т-критерия Вилкоксона.

На фигурах 9-17 приведены данные, иллюстрирующие уровни IFN- $\gamma$ -продуцирующих цитотоксических и/или хелперных Т-клеток памяти при стимуляции мононуклеаров

периферической крови COVID-реконвалесцентов вакцинными кандидатами, в сравнении со стимуляцией контрольным вакцинным штаммом – вирусным вектором. Для рекомбинантных вирусов CoVac-13, CoVac-15, CoVac-16 было показано достоверное увеличение субпопуляции CD4+ Т-клеток эффекторной памяти (CD3+CD4+CCR7-) в сравнении с вирусным вектором (Фигуры 9-11). Для рекомбинантных вирусов CoVac-17, CoVac-29, CoVac-30, CoVac-31, CoVac-32 и CoVac-30, было показано достоверное увеличение как субпопуляции Т-хэлперов (CD4+), так и субпопуляции цитотоксических (CD8+) Т-клеток эффекторной памяти в сравнении с вирусным вектором (Фигуры 12-17).

Стимуляция мононуклеарных клеток двух доноров крови, не встречавшихся ранее с SARS-CoV-2, всеми исследованными рекомбинантными вирусами не приводила к достоверному увеличению секреции IFN-γ хэлперными или цитотоксическими Т-клетками памяти, по сравнению со стимуляцией вирусным вектором ЖГВ H7N9 (Фигура 18), что подтверждает специфичность использованного метода для оценки процессинга человеческими иммунными клетками полиэпитопных кассет SARS-CoV-2, встроенных в геном вируса гриппа.

**Таблица 8.** Рекомбинантные вакцинные штаммы вируса гриппа, изученные в *in vitro* тесте на мононуклеарах периферической крови COVID-19 реконвалесцентов

Условное обозначение штамма	Описание вакцинного штамма
Эксперимент 1	
CoVac-13	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 6 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-15	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 9 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-16	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 4 в гене N9-NA
CoVac-17	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 5 в гене N9-NA
ЖГВ H7N9	Штамм живой гриппозной вакцины A/17/Ануи/2013/62 (H7N9), полученный методами обратной генетики [PMID: 30903496]
Эксперимент 2	

CoVac-29	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 10 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-30	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 15 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-31	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 16 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-32	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 17 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
CoVac-33	Реассортантный штамм 6:2 подтипа H7N9 со вставкой кассеты 18 в гене NS1, укороченном до 126 а.к.
ЖГВ H7N9	Штамм живой гриппозной вакцины A/17/Ануи/2013/62 (H7N9), полученный методами обратной генетики [PMID: 30903496]

**Таблица 9.** Демографические данные добровольцев

№ доброво- вольца	пол	Возраст, лет	COVID-19 подтвержден		Тяжесть заболевания	Срок забора крови после заболевания
			ПЦР	ИФА		
Эксперимент 1						
1	М	36	+	+	Легкая	1 мес
2	Ж	28	-	+	Легкая	1 мес
3	Ж	44	+	+	Тяжелая	1 мес
4	Ж	47	+	+	Тяжелая	1 мес
5	М	42	-	+	Легкая	2 мес
6	Ж	34	-	+	Легкая	2 мес
7	М	40	+	+	Тяжелая	2 мес
8	М	29	+	+	Легкая	2 мес
9	М	30	+	+	Легкая	1 мес
10	Ж	33	+	+	Легкая	1 мес
11	Ж	39	-	+	Легкая	3 нед
12	М	34	-	+	Легкая	2 мес
13	Ж	43	-	+	Легкая	2 мес
Эксперимент 2						
1	Ж	18	-	+	Легкая	1 мес
2	Ж	44	-	+	Легкая	1 мес

3	М	42	-	+	Легкая	2 мес
4	М	45	+	+	Легкая	3 мес
5	Ж	34	-	+	Легкая	2 мес
6	М	41	-	+	Легкая	2 мес
7	М	40	+	+	Тяжелая	2 мес
8	Ж	44	+	+	Тяжелая	6 мес
9	М	36	+	+	Легкая	6 мес
10	Ж	49	+	+	Тяжелая	6 мес
11	Ж	47	+	+	Тяжелая	6 мес
12	Ж	33	+	+	Легкая	6 мес
13	М	46	+	+	Легкая	6 мес
14	М	34	+	+	Легкая	6 мес
15	М	39	+	+	Легкая	6 мес
16	Ж	37	+	+	Легкая	6 мес
17	М	31	+	+	Легкая	6 мес

## Формула изобретения

1. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, который состоит из:

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3;

и, при необходимости, 1 фрагмент из мембранного белка коронавируса с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5,

где

по меньшей мере 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса выбирают из группы: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13;

по меньшей мере 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса выбирают из группы: SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21;

фрагмент из мембранного белка коронавируса представляет собой SEQ ID NO: 22.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где кодируемый полипептид содержит от 1 до 4 фрагментов из гликопротеина S коронавируса.

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 2, где кодируемый полипептид содержит 1 фрагмент из гликопротеина S коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 2 фрагмента из гликопротеина S коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 3 фрагмента из гликопротеина S коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 4 фрагмента из гликопротеина S коронавируса.

4. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где кодируемый полипептид содержит от 1 до 4 фрагментов из нуклеопротеина коронавируса.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по 4, где кодируемый полипептид содержит 1 фрагмент из нуклеопротеина коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 2 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 3 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса; или

где кодируемый полипептид содержит 4 фрагмента из нуклеопротеина коронавируса.

6. Выделенная нуклеиновая кислота по 1, где кодируемый полипептид содержит фрагмент мембранного белка коронавируса.

7. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33 или SEQ ID NO:36; или

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25; или

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 35.

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 37; или

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; или

где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

8. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп.1 и 6, в которой кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 or SEQ ID NO: 31.

9. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, которая содержит нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по п.1, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

11. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 10, где бета-коронавирус представляет собой вирус SARS-CoV-2.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный полипептид для увеличения титра антител к вирусу гриппа, содержащий фрагменты из белков коронавируса и содержащий аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

13. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 12, которая содержит нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, которая включает нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 59-76, которые, соответственно, кодируют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-40.

14. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 12, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

15. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 14, где бета-коронавирус представляет собой вирус SARS-CoV-2.

16. Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, который содержит нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-15.

17. Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по п. 16, где выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из аттенуированного вируса гриппа.

18. Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по п. 16, где выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса гриппа типа H2N2.

19. Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по п. 16, где выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа получают из вируса A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) или его производных.

20. Выделенный рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по п. 16, где нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-15 находится в гене нейраминидазы (NA) или гене NS вируса гриппа.

21. Фармацевтическая композиция для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, содержащая рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по любому из пп. 16-20 в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

22. Применение рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа по любому из пп. 16-20 или фармацевтической композиции по п. 21 для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа.



23. Применение по п. 22 для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

24. Применение по п. 23, где специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

25. Применение по п. 23, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

26. Применение по п. 23, где коронавирус выбирают из группы, которая содержит коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

27. Вакцина для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, включающая рекомбинантный вирус на основе вируса гриппа по любому из пп. 16-20 в эффективном количестве.

28. Вакцина по п. 27 для индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа и заболеваний, вызванных коронавирусом.

29. Вакцина по п. 28, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

30. Вакцина по п. 28, где коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

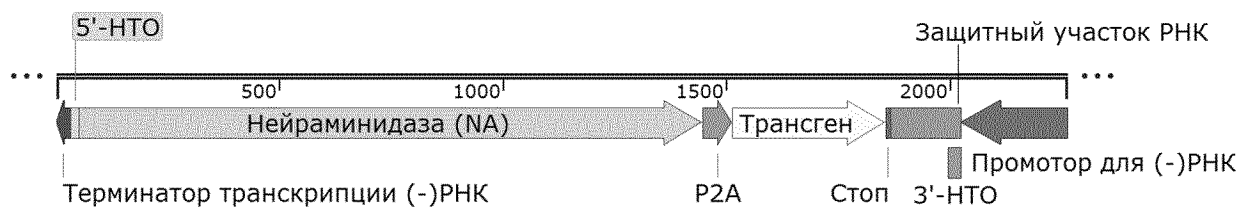
31. Вакцина по п. 28, где специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.

32. Способ индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и/или профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, или индукции специфического иммунитета к вирусу гриппа и коронавирусу или комбинированной профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа, и заболеваний, вызванных коронавирусом, включающий введение рекомбинантного вируса на основе вируса гриппа по любому из пп. 16-20, фармацевтической композиции по п. 21 или вакцины по п. 27, в эффективном количестве.

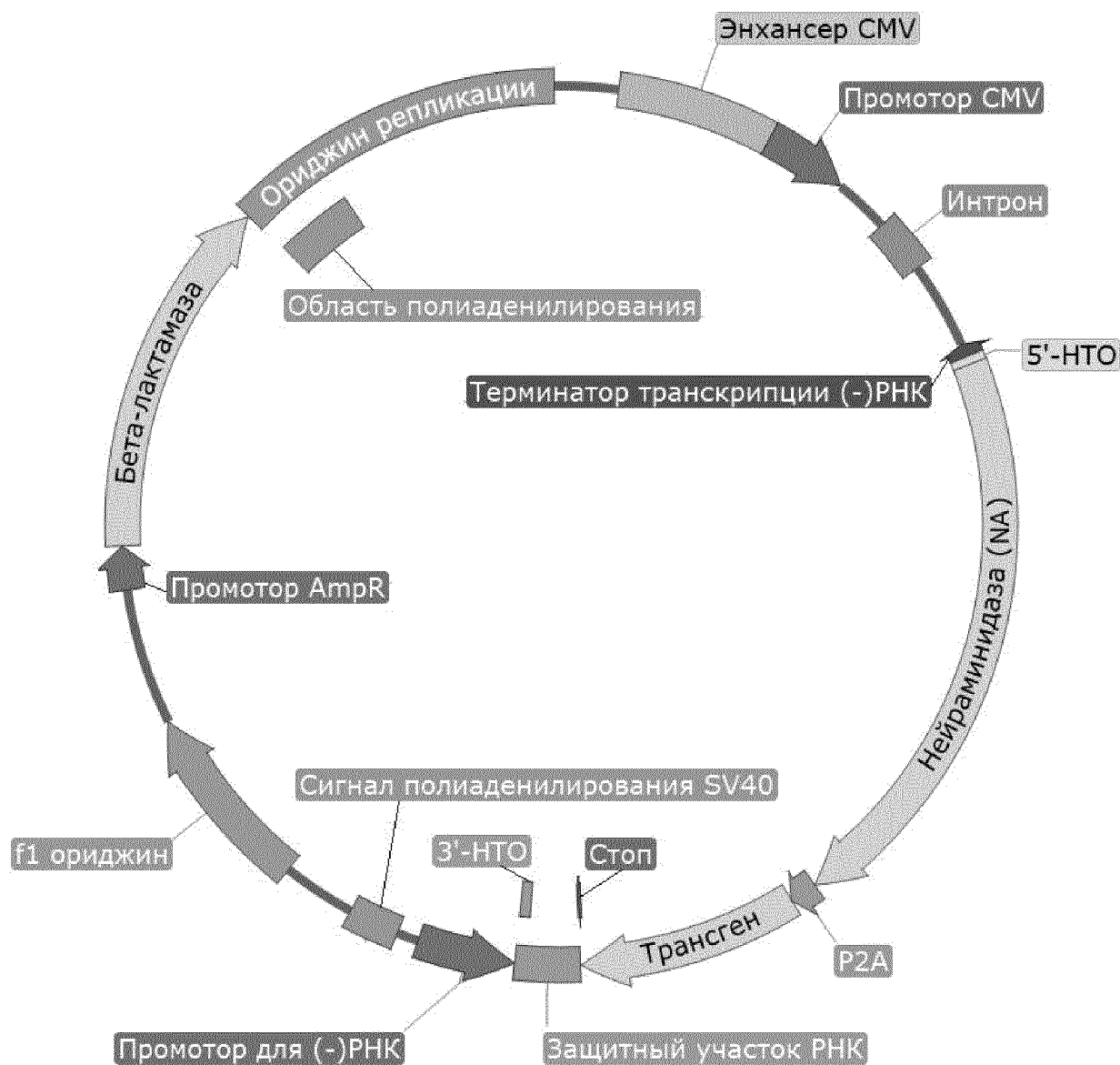
33. Способ по п. 32, где коронавирус представляет собой бета-коронавирус.

34. Способ по п. 32, где коронавирус выбирают из группы, которая включает коронавирус человека OC43, коронавирус человека HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV или SARS-CoV-2.

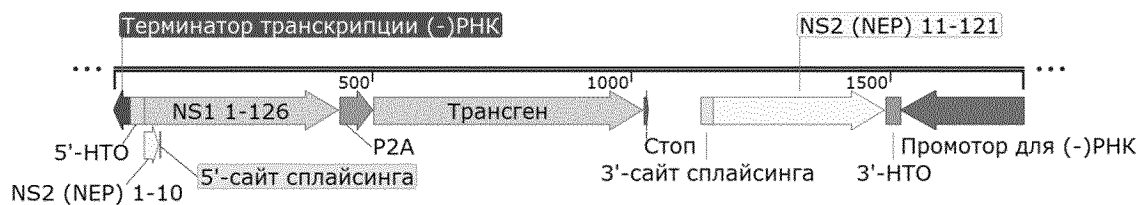
35. Способ по п. 32, где специфический иммунитет к коронавирусу представляет собой специфический Т-клеточный иммунитет.



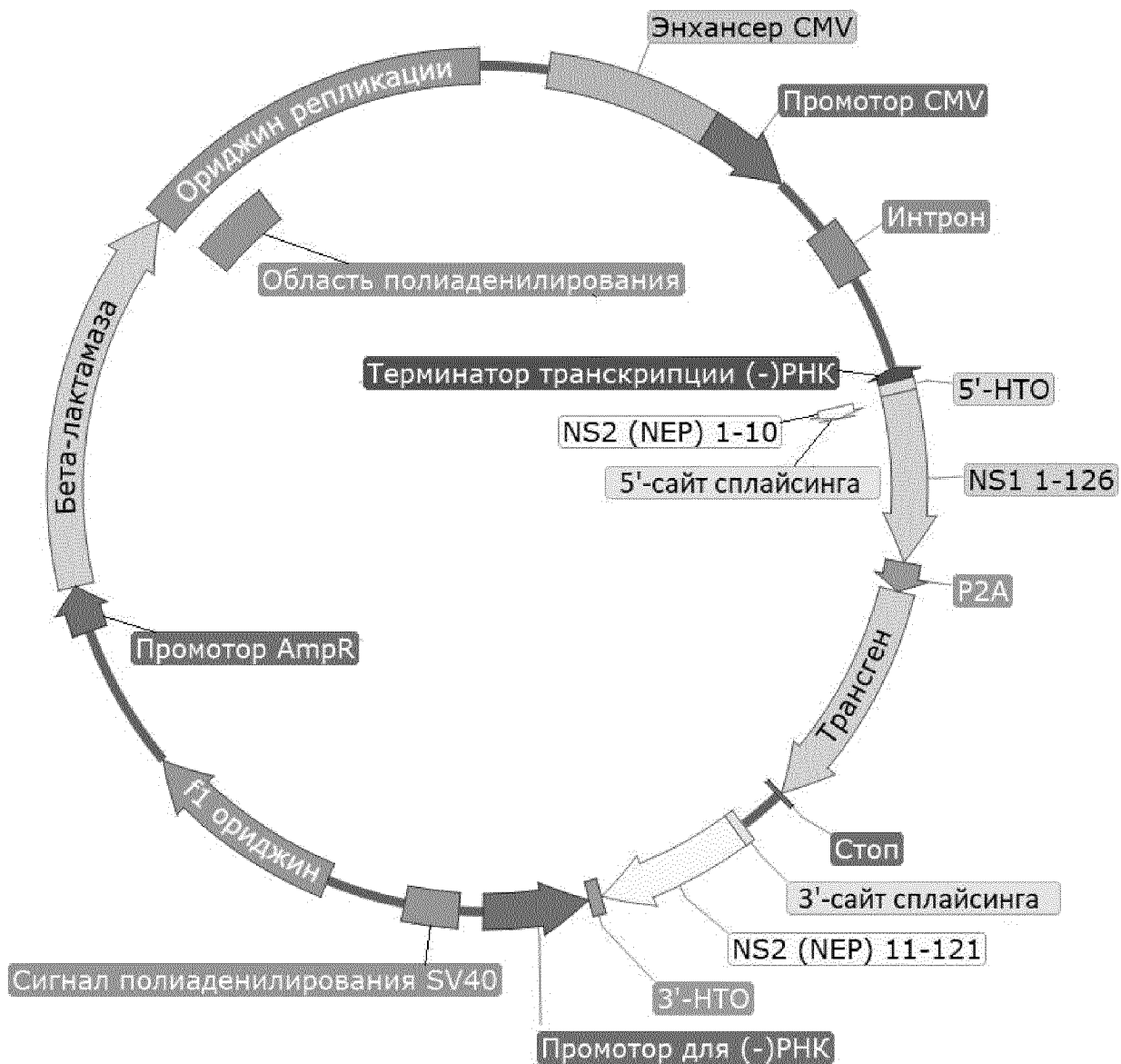
Фиг. 1



Фиг. 2.

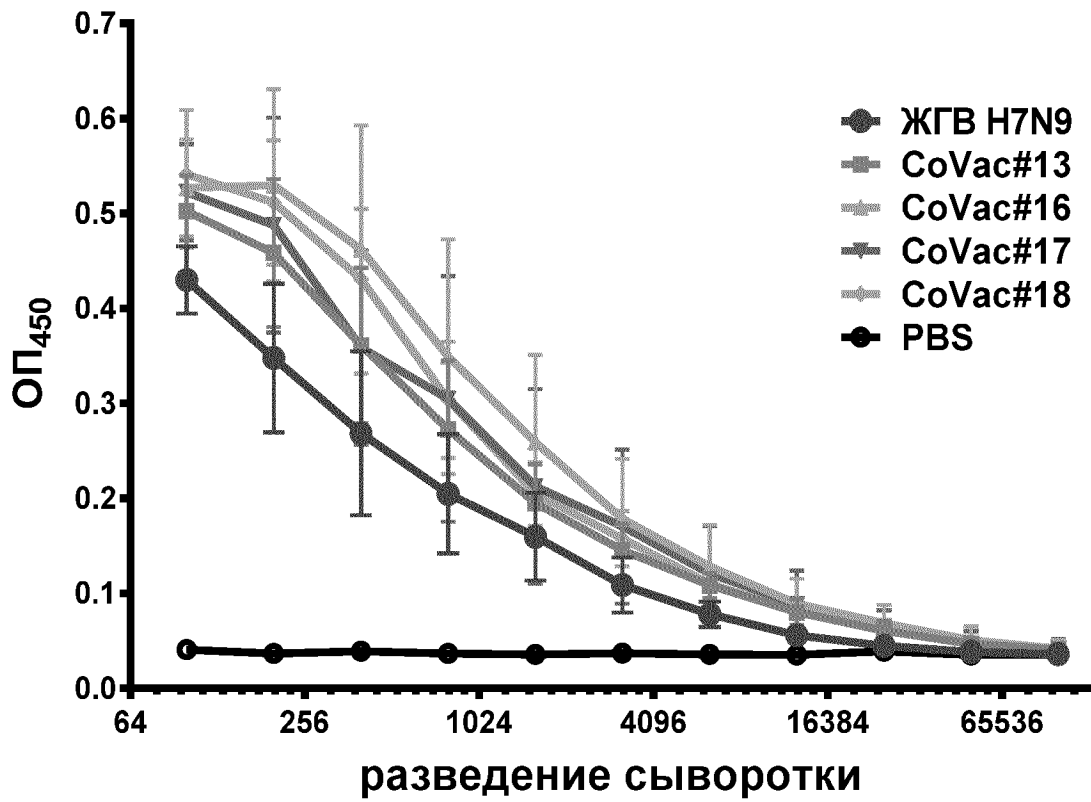


Фигура 3.



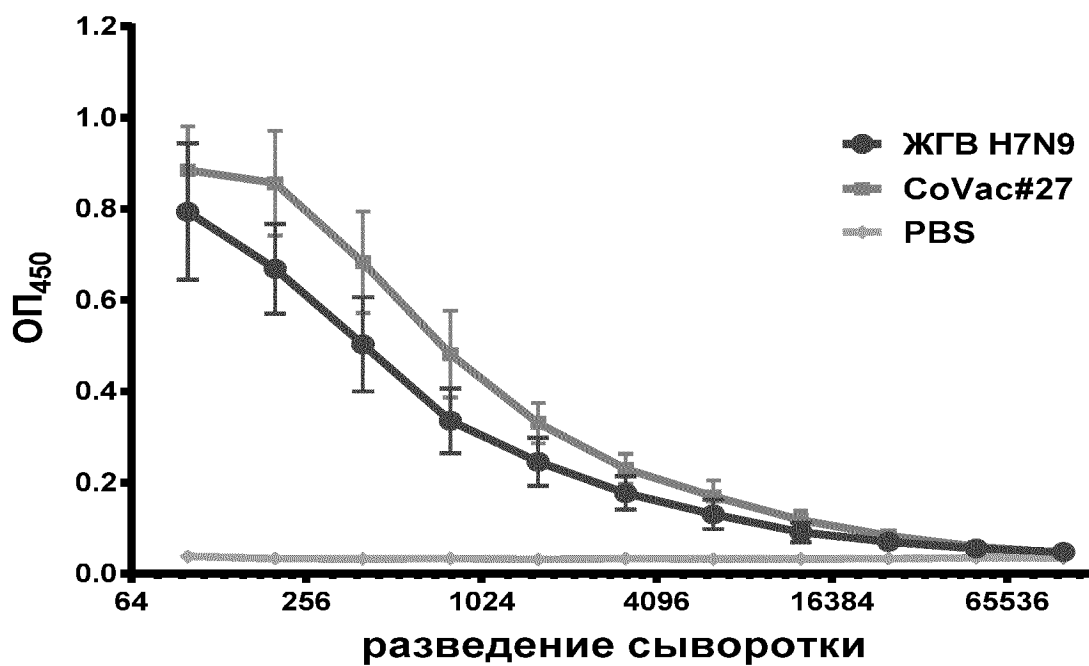
Фиг. 4.

### Оптическая плотность (450 нм)



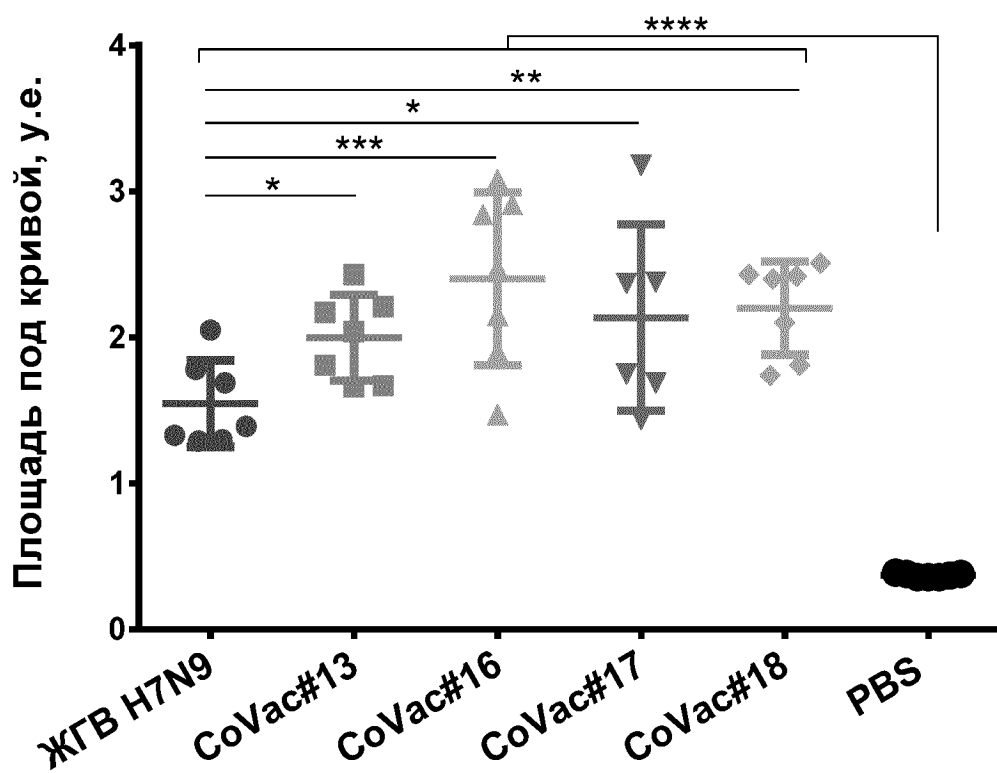
Фиг. 5.

### Оптическая плотность (450 нм)



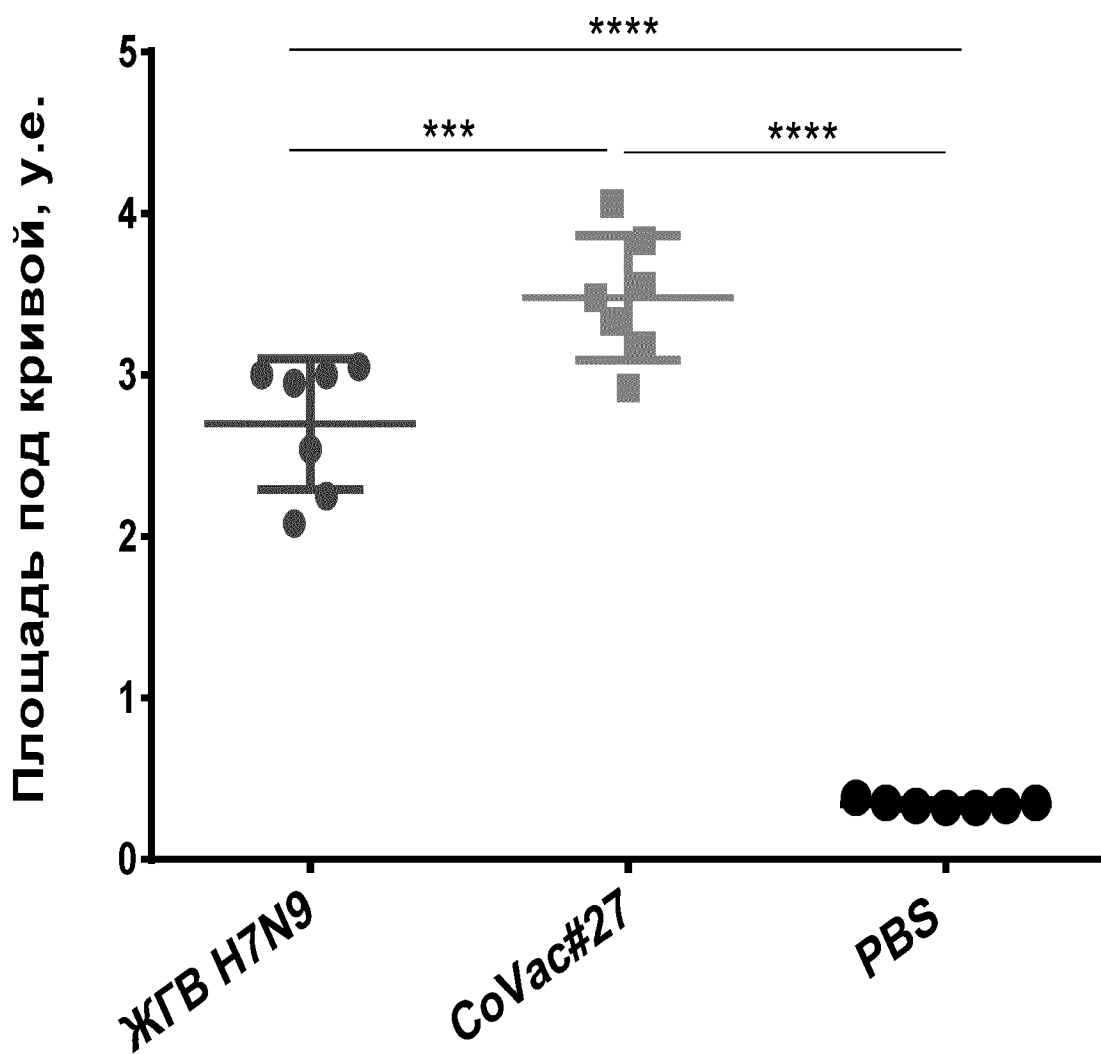
Фиг. 6.

### Площадь под кривой оптической плотности

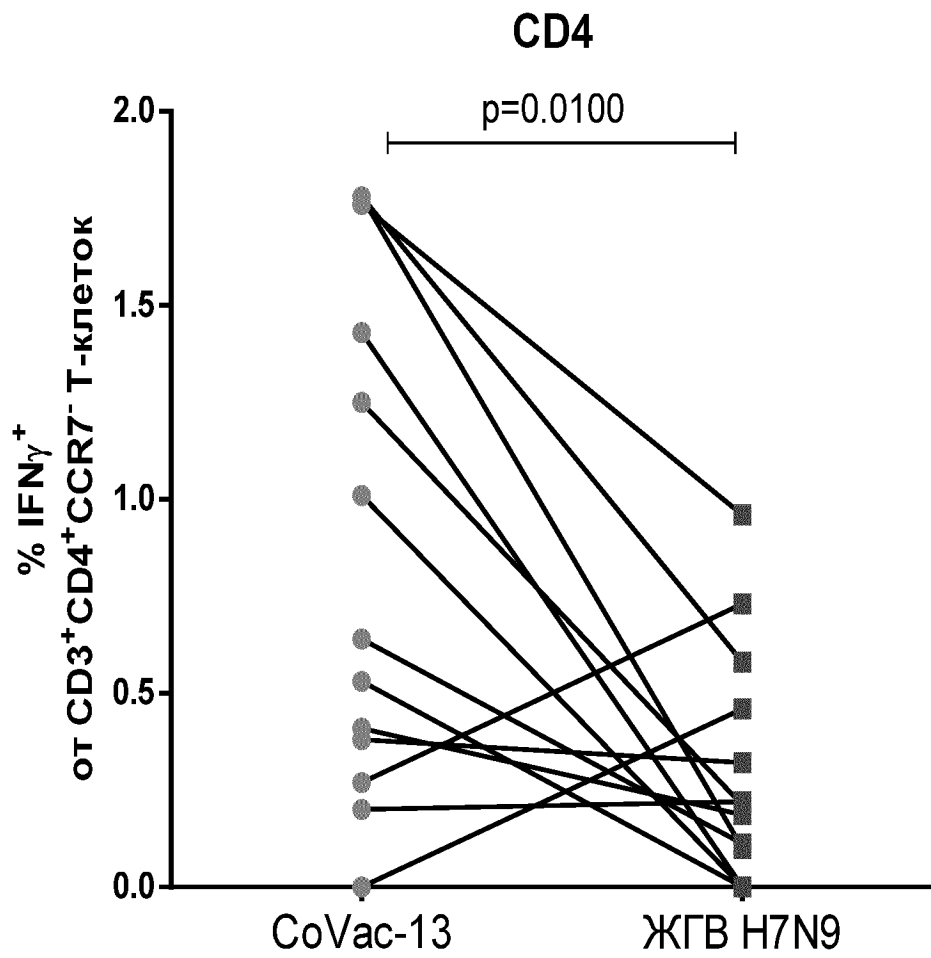


Фиг. 7.

## Площадь под кривой оптической плотности

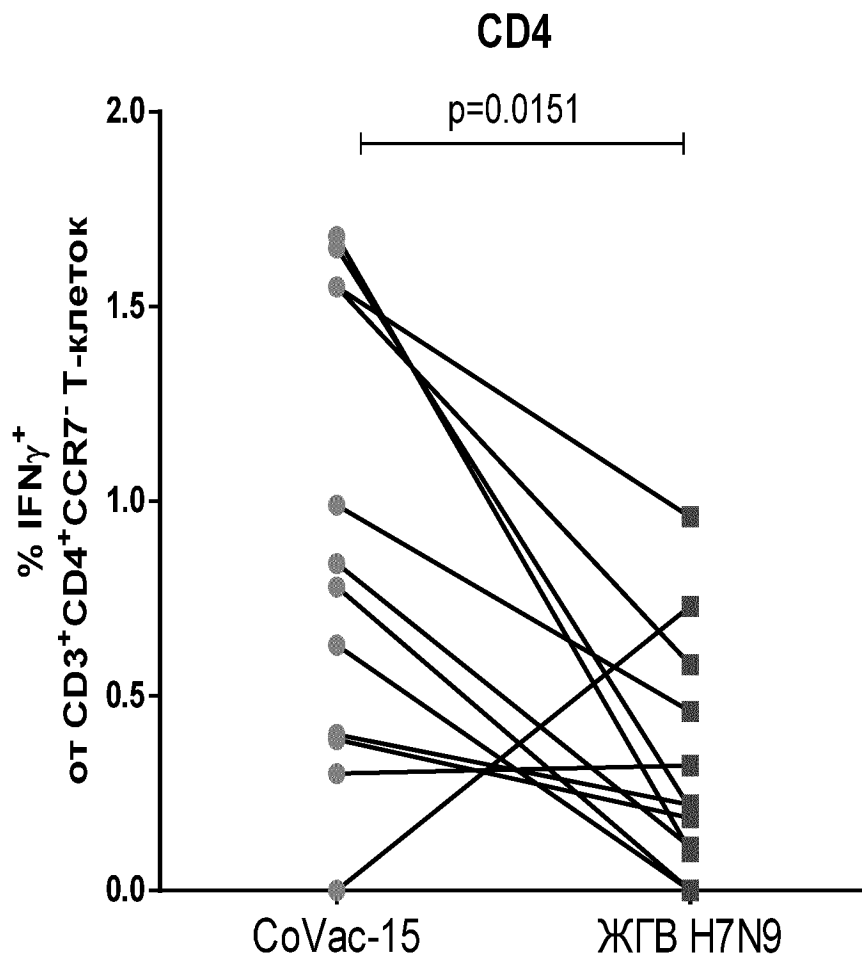


Фиг. 8.

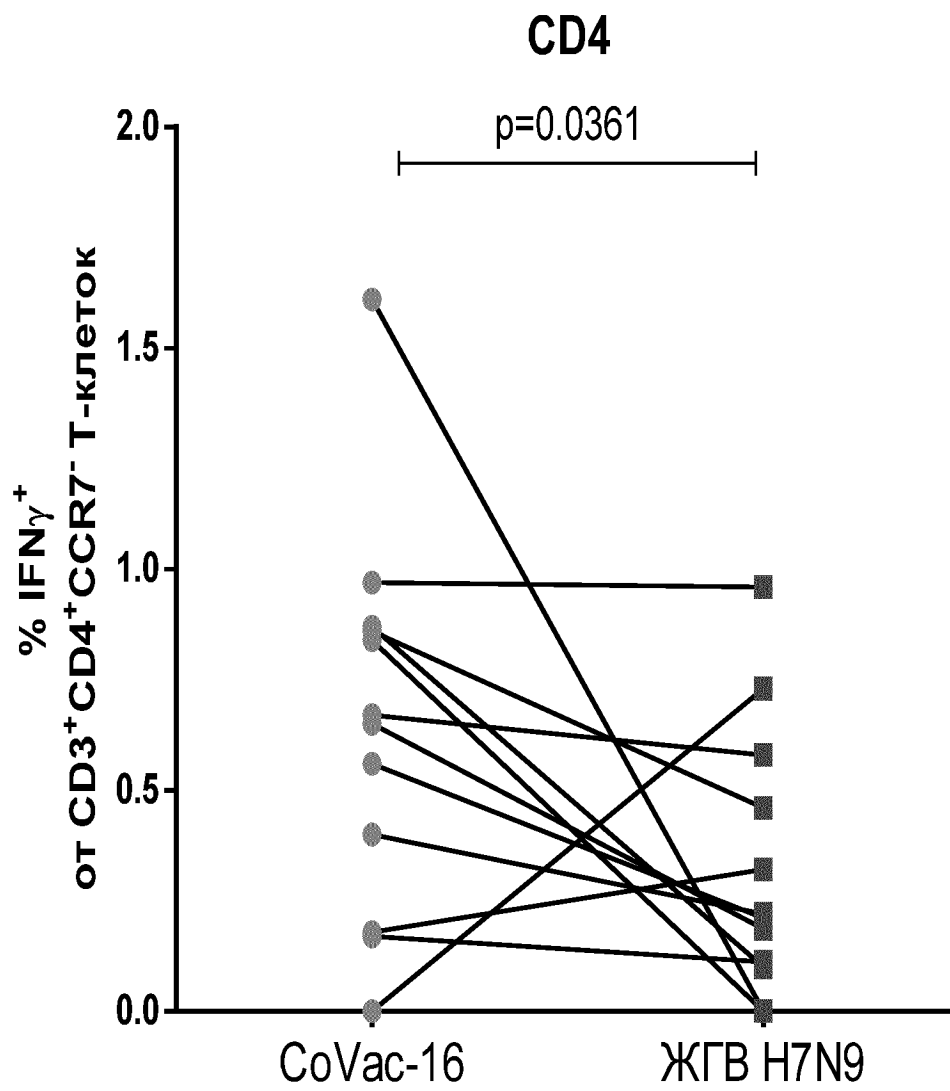


Фиг. 9.

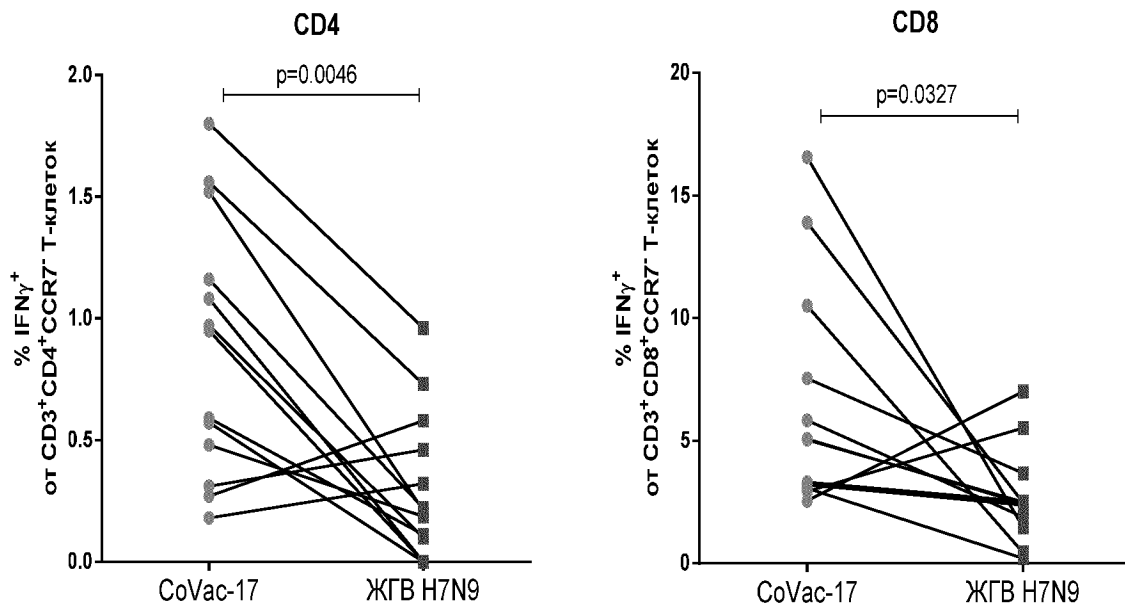




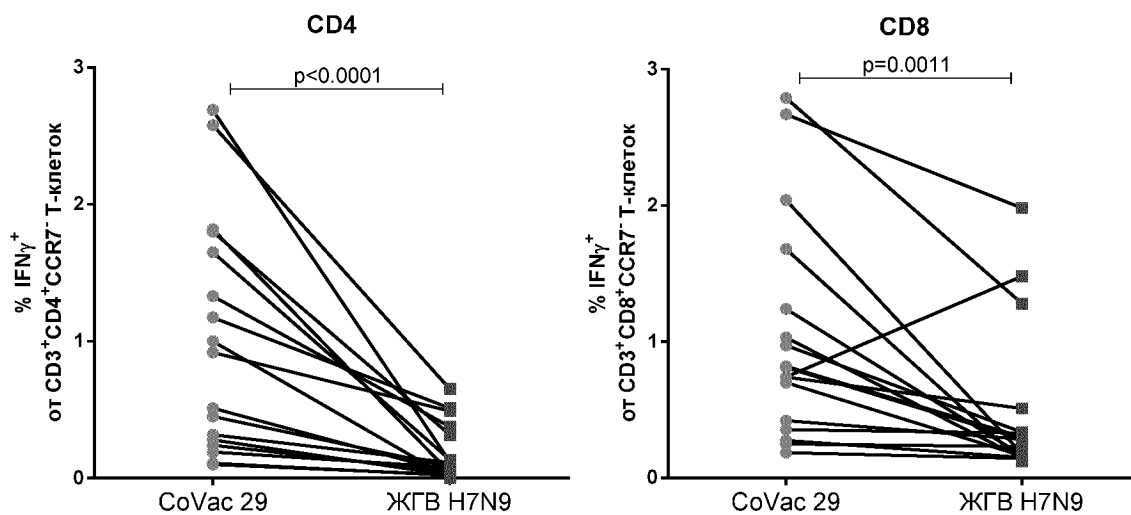
Фиг. 10



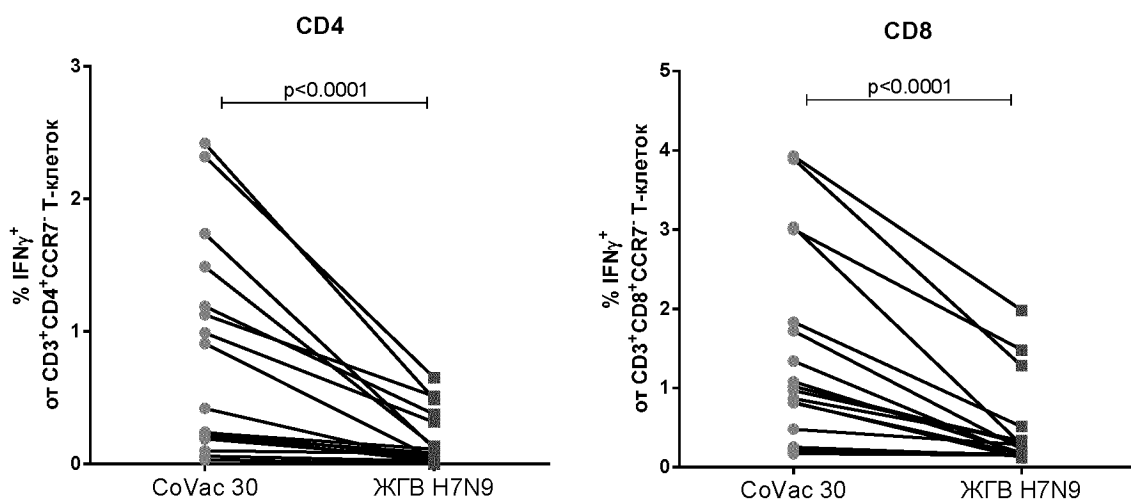
Фиг. 11



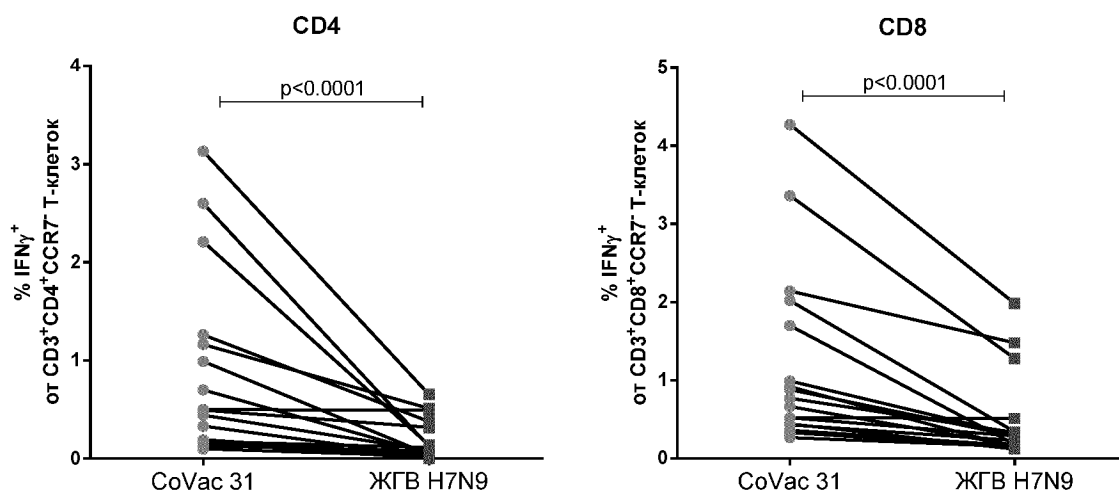
Фиг. 12.



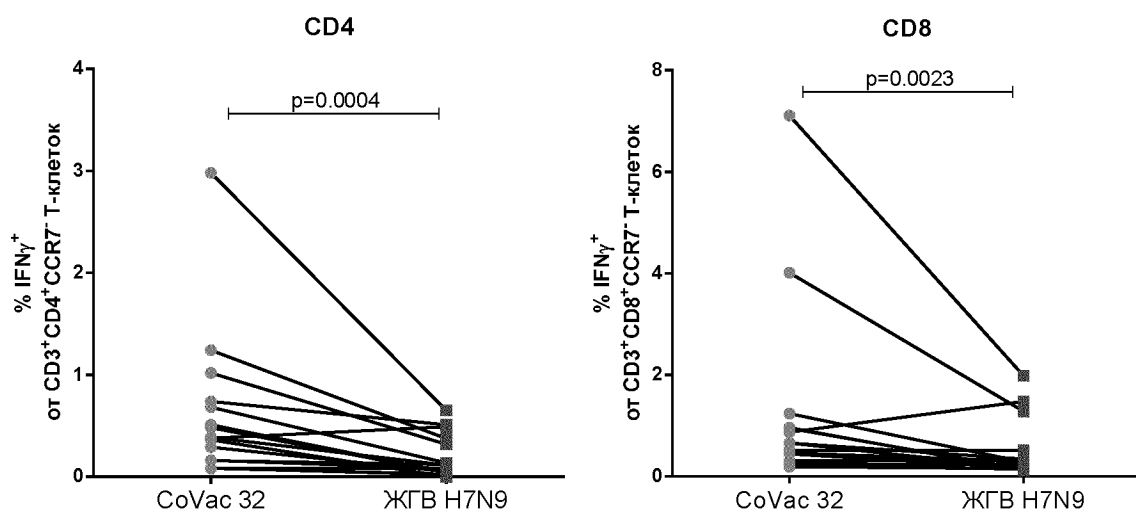
Фиг. 13



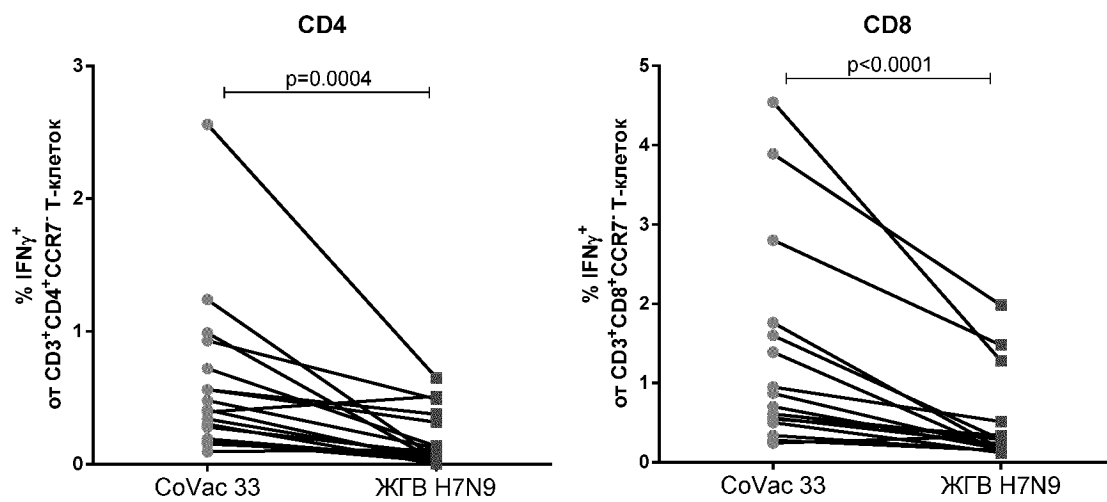
Фиг. 14



Фиг. 15

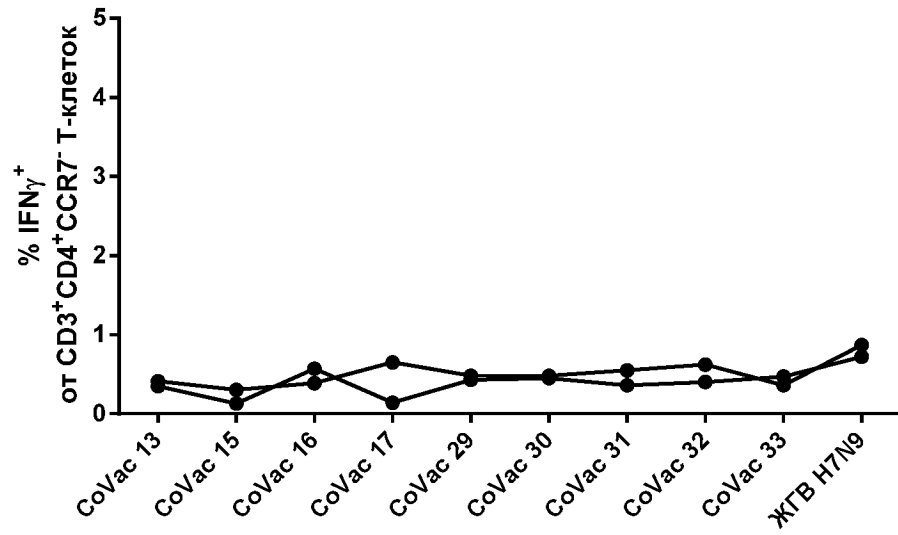


Фиг. 16

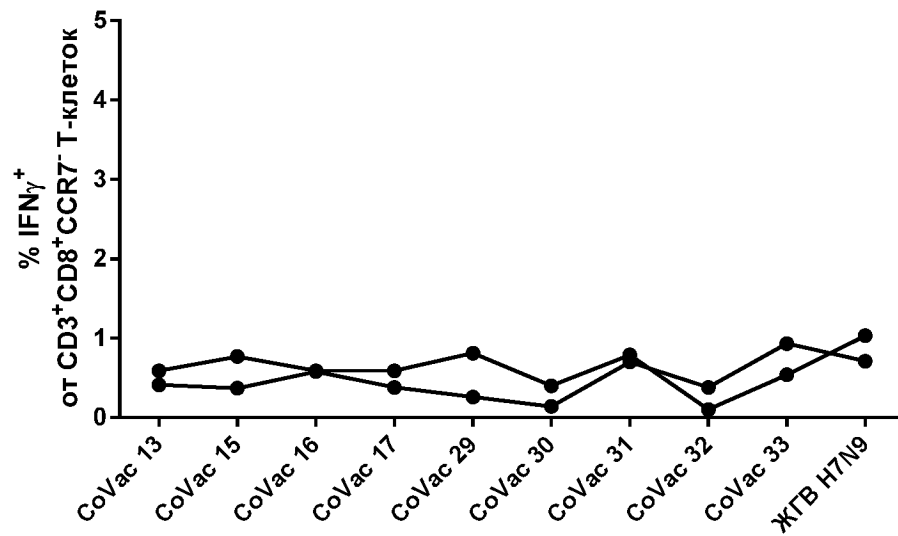


Фиг. 17

### CD4



### CD8



Фиг. 18.

	S958-986	Conservancy	S976-984	Conservancy	S1220-1228	Conservancy
SARS-CoV-2-Wuhan (MN908947.3)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
SARS-CoV-Urbani (AY278741.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
hCoV-HKU1-Genotype-B (AY884001)	A L N A Y V S Q Q	56%	S L Q E I L S R L	67%	L I V I L F I I F	33%
hCoV-OC43 (KF923903)	A L N N I L Q Q L	78%	S L Q E I L S R L	67%	C I A G N R G I A	44%
hCoV-NL63 (NC005831)	A L N H L T S Q L	67%	S I Q A I Y D R L	33%	R I A Q R S A L E	44%
hCoV-229E (KY983587)	A L N V F V S H T	44%	F S L A I Q S R L	44%	S Y D S V S A I V	33%
MERS (NC019843)	A L N E S Y I K L	44%	N K W P W Y I W L	11%	F I K G K V A L A	67%
BAT-SL-CoV-WiV16 (KT444582)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-SL-CoV-WiV1 (KF367457.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-SL-CoV-YNLF31C (KP886808.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	Y I N E L M A I V	56%
BAT-SARS-CoV-RS672 (FJ588686.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-CoV-RATG13 (MN996532.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-CoV-YN01 (EPIISL412976)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-CoV-YN02 (EPIISL412977)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-CoV-19-ZXC21 (MG772934.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
BAT-SARS-RCoV (FJ211859.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
SARS-CoV-Civet007 (AY572034.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
SARS-CoV-A022 (AY686863.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
SARS-CoV-B039 (AY686864.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A I V	100%
PCoV-GX-P2V (MT072864.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-GX-P5E (MT040336.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-GX-P5L (MT040335.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-GX-P1E (MT040334.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-GX-P4L (MT040333.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-MP789 (MT084071.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-GX-P3B (MT072865.1)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-Guangdong-P2S (EPIISL410544)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
PCoV-Guangdong (EPIISL410721)	A L N T L V K Q L	100%	V L N D I L S R L	100%	F I A G L I A L V	89%
Camel-CoV-HKU23 (KT368891.1)	A L N A L V S Q Q	67%	V L C K I A S L Q	44%	F I A Q R I D S V	56%
DcCoV-HKU23 (MN514967.1)	A L N A L V S Q Q	67%	V L N D I A S L Q	67%	F I A Q R I D S V	56%
MERS-CoV-Jeddah (KF917527.1)	A L N A L V S Q Q	67%	V L N D I A S L Q	67%	F I A Q R I D S V	56%
Riyadh/RY141 (NC028752.1)	A L N A L V S Q Q	67%	V L C K I A S L Q	44%	F I I R L T A H M	44%

Фиг. 19.