

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
06 июля 2023 (06.07.2023)



(10) Номер международной публикации
WO 2023/128813 A1

(51) Международная патентная классификация:
C07K 14/08 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

НИШИН, Тарас Владимирович (IVANISHIN, Taras Vladimirovich); Загородное шоссе, 8-3-40, Москва, 117152, Moscow (RU). **КРАСИЛЬНИКОВ, Игорь Викторович (KRASILNIKOV, Igor Viktorovich)**; ул. Довженко, 8-1-14, Москва, 119590, Moscow (RU).

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/000408

(74) Агент: **КОТЛОВ, Дмитрий Владимирович и др. (KOTLOV, Dmitry Vladimirovich et al.)**; ул. Луговая, 4, корп. 2, Москва, 121205, Moscow (RU).

(22) Дата международной подачи:
30 декабря 2022 (30.12.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2021139955 30 декабря 2021 (30.12.2021) RU

(71) Заявитель: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "БЕТУВАКС" ("BETUVAKS" LIMITED LIABILITY COMPANY)** [RU/RU]; ул. 2-я Филевская, 7, корп. 6, э/п/к/рм 1/III/7/39, Москва, 121096, Moscow (RU).

(72) Изобретатели: **ИСАЕВ, Артур Александрович (ISAEV, Artur Alexandrovich)**; ул. Новодмитровская, 2-7-588, Москва, 127051, Moscow (RU). **КУДРЯВЦЕВ, Александр Викторович (KUDRYAVTSEV, Alexander Viktorovich)**; ул. Менделеева, 39, г. Саров, Нижегородская область, 607182, Nizhegorodskaya oblast', g. Sarov (RU). **ФРОЛОВА, Мария Евгеньевна (FROLOVA, Maria Evgenievna)**; ул. Коштоянца, 20-2-33, Москва, 119602, Moscow (RU). **ВАХРУШЕВА, Анна Владимировна (VAKHRUSHEVA, Anna Vladimirovna)**; ул. Александры Монаховой, 43-2-130, Москва, 108814, Moscow (RU). **ИВАНОВ, Александр Викторович (IVANOV, Alexander Viktorovich)**; ул. Николая Островского, 64а-17, г. Пермь, Пермский край, 614007, Permskiy kraj, g. Perm' (RU). **ДЖОНОВИЧ, Милана (DJONOVIC, Milana)**; ул. Фрушкогорска, 4-2, г. Нови Сад, 21000, g. Novi Sad (RS). **ИВА-**

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: ANTIGENS FOR INDUCING IMMUNITY AGAINST THE SARS-COV-2 VIRUS AND GENE CONSTRUCTS FOR THE EXPRESSION THEREOF

(54) Название изобретения: АНТИГЕНЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2 И ГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ

(57) Abstract: The invention relates to biotechnology, immunology and virology, and more particularly to an antigen composition that allows the induction of a specific humoral and cellular immune response to the requisite epitope of the SARS-CoV-2 viral coat protein. For this purpose, a gene construct is proposed which includes an expression cassette organized in the form of a modular construct that allows the substitution of regions coding for the signal peptide, the target SARS-CoV-2 recombinant protein-antigen RBD-SD1, fused with an Fc fragment of immunoglobulin by a linker. Also proposed is a method for obtaining recombinant proteins based on a region of the SARS-CoV-2 S protein including RBD and SD1 and fused with an Fc fragment of IgG.

(57) Реферат: Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии, а именно, к антигенной композиции, позволяющей вызвать индукцию специфического гуморального и клеточного иммунного ответа к необходимому эпитопу белка вирусной оболочки SARS-CoV-2. Для этого разработана генетическая конструкция, включающая экспрессионную кассету, организованную в формате модульной конструкции, позволяющей осуществлять замены участков, кодирующих сигнальный пептид, целевой рекомбинантный белок-антиген RBD-SD1 SARS-CoV-2, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина через линкер. Также разработан способ получения рекомбинантных белков на основе участка S-белка SARS-CoV-2, включающего RBD и SD1, слитого с Fc-фрагментом IgG.

WO 2023/128813 A1

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)

АНТИГЕНЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2 И ГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ

5

Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии, вирусологии и касается создания генной конструкции, включающей варианты экспрессионных кассет, кодирующих рекомбинантные белки на основе участка S-белка SARS-CoV-2, включающего RBD и SD1, слитого с Fc фрагментом IgG, которые в сочетании с бетулином могут быть использованы как активная субстанция, вызывающая выработку антител против вируса SARS-CoV-2.

Уровень техники.

Вакцинация рассматривается в современных условиях как одно из наиболее эффективных средств борьбы с инфекцией. Таким образом, многие страны и фармацевтические компании включились в разработку вакцин и лекарственных препаратов против SARS-CoV-2, нового РНК-содержащего вируса, относящегося к семейству Coronaviridae к линии Beta-CoV.

При традиционной технологии создания вакцин на основе использования полноразмерного патогена резко возрастает сложность производства, обусловленная опасностью работы и необходимостью строгого контроля за полнотой инактивации возбудителя, что делает данный вариант менее экономически выгодным. В связи с этим, проверенная временем технология получения вакцин на основе субъединицы вируса имеет определённые преимущества, такие как безопасность и возможность повторного введения. Однако отдельные вирусные субъединицы имеют низкую иммуногенность, вследствие чего необходимо использование адъювантов.

Вакцины на основе целых инактивированных вирусов, в целом, широко используются в иммунизации, однако имеют серьёзные недостатки – от технологических, связанных с трудностью получения быстро больших количеств препарата в сжатые сроки, до проблем, связанных с эффективностью – нежелательные побочные эффекты и проблемы с таргетностью вырабатываемых антител на необходимый эпитоп белков вирусной оболочки.

Вакцины на основе нуклеиновых кислот основаны на принципе введения в клетки генетической информации, с которой продуцируются белки патогена, вызывающие иммунную реакцию. На данный момент, к слову, ни одна из ДНК или РНК вакцин не утверждена для профилактики инфекционных заболеваний человека. Из недостатков следует отметить низкую иммуногенность. В случае использования для доставки

40 вирусных векторов существует опасность интеграции чужеродной ДНК в геном клетки, возможное развитие аутоиммунных реакций против клеток, экспрессирующих антигенный протеин, или реакция на чужеродную ДНК. Помимо этого, существуют трудности с доставкой таких препаратов. Стоит отметить, что РНК и ДНК вакцины, а также вакцины на основе аденовирусных векторов вызывают определённую осторожность в использовании, так как неизвестны долговременные последствия их применения. Помимо этого, аденовирусные вакцины могут вызвать иммунную реакцию на сам аденовирус, а также их невозможно будет использовать без внесения модификаций повторно.

50 Субъединичные вакцины представлены, прежде всего, рекомбинантными препаратами, на основе очищенных белков. При создании таких типов вакцин важной частью является поиск новых подходящих адъювантов. Их использование позволяет уменьшить дозу антигена, снизить стоимость конечного препарата, повысить иммуногенность «слабых» или малых антигенов, на которые чрезвычайно сложно выработать иммунитет и получить вакцину к данному классу антигенов. Это позволяет предотвратить конкуренцию антигенов в комбинированных вакцинах, увеличить скорость развития и продолжительность иммунного ответа у привитых, индуцировать защитные свойства слизистых оболочек, а также увеличить силу иммунного ответа. В настоящее время признано невозможным создание эффективных и безопасных вакцин без применения адъювантов.

60 За функцию проникновения коронавируса в клетки хозяина отвечает RBD (рецептор-связывающий домен) S-белка, а также отдельные его эпитопы. В экспериментальных исследованиях установлено, что большинство антител, обладающих вируснейтрализующей активностью в отношении вида коронавирусов (например, MERS или SARS), специфически связываются с различными эпитопами RBD. RBD образует сайт связывания с рецептором ACE2, поэтому антитела, способные связываться с RBD доменом, могут блокировать контакт с рецептором и, как следствие, препятствовать проникновению вируса в клетки, что в случае SARS-CoV-2 установлено. На основании этого, в качестве последовательности для создания антигена была выбрана именно последовательность RBD. Стоит отметить, что выбор целого S-белка мог бы привести к выработке не только нейтрализующих антител, но и маскирующих, повышая развитие антитело-зависимого усиления инфекции.

70 Домен S1 состоит из субдомена NTD (N-концевой домен), RBD (остатки 319-527), и субдоменов SD1 и SD2, которые наиболее близки к домену S2. Таким образом, важнейшей задачей вакцинации является не просто выработка антител к S-белку, а именно нейтрализующих антител к RBD. Однако, простое использование RBD в качестве антигена вакцины не представляется возможным, так как масса белка довольно мала

75 (менее 40 кДа), а также он быстро выводится из организма, поэтому кандидатом в антигены стал RBD, конъюгированный с Fc фрагментом IgG.

Добавление адъюванта позволит снизить количество белка на дозу, себестоимость вакцины и позволит увеличить иммунный ответ на антиген. В настоящее время в экспериментальных и клинических исследованиях применяют: минеральные (гидроксид
80 или фосфат алюминия), растительные (сапонины – QuilA, QS21), микробные (убитые бактерии, липополисахарид, и его производные, CpG-мотивы ДНК) и другие виды адъювантов. Вследствие токсичности или недостаточной эффективности большинства адъювантов для общего использования разрешены только соли алюминия и водно-
85 масляные эмульсии MF-59, AS03, QS 21, VLP (virus-like particles) и ИСКОМы (ImmunoStimulating COMplex). Наиболее перспективными являются корпускулярные адъюванты – сферические аморфные наночастицы (САНЧ). Одна из причин использования – их эффективное поглощение антиген-представляющими клетками иммунной системы, что приводит к усилению иммунного ответа. К таким адъювантам можно отнести бетулиновые адъюванты на основе тритерпеноидов из экстракта бересты
90 (патент RU2545714). Бетулиновые частицы, кроме выраженного спектра биологической активности (противомикробное, противогрибковое, противовирусное действия, гепатопротективное, противовоспалительное, противораковое, противоаллергическое, мембранстабилизирующее, иммуномодулирующее, антиоксидантное), обладают и адъювантными свойствами.

95 Из патента RU2749193 известны варианты использования антигенов, включающие RBD для индукции специфического иммунитета против вируса SARS-CoV-2 в качестве антигенного компонента, вместе с бетулиновыми сферическим аморфными наночастицами (САНЧ) размера 80-160 нм в качестве адъюванта. Сферические частицы на основе тритерпеноидов из бересты - бетулина (бетуленол, бетулинол, лупендиол)
100 охарактеризованы на фиг. 1 и фиг. 2. Данный адъювант производится в промышленных масштабах в соответствии с требованиями опытно-промышленного регламента, а также был протестирован ранее в доклинических исследованиях гриппозных вакцин, где показал хорошие иммуногенные свойства и безопасность использования.

105 **Раскрытие сущности изобретения.**

Существенный недостаток известных вакцин против SARS-CoV-2 состоит в сложности их производства, недостаточной иммуногенной активности, нежелательных побочных явлениях, и проблемах с таргетностью вырабатываемых антител к необходимому эпитопу белка вирусной оболочки. Техническая задача настоящего
110 изобретения заключается в создании антигенной композиции, позволяющей вызвать индукцию специфического гуморального и клеточного иммунного ответа к необходимому

эпиту по белка вирусной оболочки SARS-CoV-2. Техническим результатом раскрываемого изобретения является создание антигенной композиции с бетулином в качестве адъюванта и рекомбинантным белком в качестве активного компонента.

115 Технический результат достигается за счет создания генетической конструкции, включающей экспрессионную кассету, организованную в формате модульной конструкции, позволяющей осуществлять замены участков, кодирующих сигнальный пептид, целевой рекомбинантный белок-антиген RBD-SD1 SARS-CoV-2 слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина через линкер.

120 Более конкретно, решение поставленной задачи и достижение технического результата изобретения осуществляется путем разработки антигена для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2, представляющего собой рекомбинантный белок, включающий участок S-белка вируса SARS-CoV-2, состоящий из аминокислотных остатков 302-638 доменов RBD и SD1, слитый с Fc фрагментом IgG посредством полиглицин-серинового линкера.

125 В некоторых вариантах изобретения полиглицин-сериновый линкер имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.

В некоторых частных вариантах изобретения антиген имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 8.

130 Еще одним вариантом изобретения также является антигенная композиция для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2, содержащая указанный антиген, буферный раствор и адъювант, где в качестве адъюванта используется корпускулярный адъювант на основе тритерпеноидов из бересты бетулин.

135 Решение поставленной задачи также осуществляется путем применения вышеуказанной антигенной композиции для индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах изобретения антигенную композицию вводят внутримышечно.

140 В некоторых вариантах изобретения под индукцией иммунитета подразумевается индукция антительного и клеточного иммунитета.

145 Решение поставленной задачи и достижение технического результата изобретения также осуществляется путем разработки генной конструкции для экспрессии рекомбинантного белка, включающего участок S-белка вируса SARS-CoV-2, состоящего из аминокислотных остатков 302-638 доменов RBD и SD1, слитого с Fc фрагментом IgG посредством полиглицин-серинового линкера, включающей экспрессионную кассету, состоящую из участков, кодирующих:

- сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2 или сигнальный пептид антитела F10 анти-TNF иммуноглобулина,

- 150 - участок с 302 по 638 аминокислотных остатков S-белка RBD-SD1 вируса SARS-CoV-2,
- полиглицин-сериновый линкер,
- Fc фрагмент IgG.

В некоторых вариантах генной конструкции кодирующая последовательность сигнального пептида S-белка SARS-CoV-2 представлена SEQ ID NO: 4.

- 155 В некоторых вариантах генной конструкции кодирующая последовательность сигнального пептида антитела F10 анти-TNF иммуноглобулина представлена SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах генной конструкции кодирующая последовательность участка S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9.

- 160 В некоторых вариантах генной конструкции полиглицин-сериновый линкер имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах генной конструкции кодирующая последовательность Fc фрагмента IgG представлена SEQ ID NO: 6.

- 165 В некоторых частных вариантах изобретения генная конструкция содержит экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 27.

В некоторых частных вариантах изобретения генная конструкция содержит экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 29.

В некоторых частных вариантах изобретения генная конструкция содержит экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 28.

- 170 В некоторых частных вариантах изобретения генная конструкция содержит экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 30.

Решение поставленной задачи и достижение технического результата изобретения также осуществляется путем разработки способа получения рекомбинантного белка - антигена для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2, включающего:

- 175 1) трансфекцию клеток яичника китайского хомячка CHO-S генной конструкцией, описанной выше;
2) культивирование трансфицированных клеток яичника китайского хомячка CHO-S;
3) отбор культуральной среды;
4) хроматографическую очистку полученного рекомбинантного белка;
180 5) подтверждение подлинности полученного рекомбинантного белка.

Краткое описание чертежей.

- 185 Фиг. 1. Охарактеризованные состоящие из бетулина сферические частицы. а) формула бетулина, б) электронные фотографии бетулиновых сферических частиц, в) размер бетулиновых корпускулярных частиц около 120-160 нм.

Фиг. 2. Изображение адъюванта в виде бетулина в сочетании с антигеном после обработки ультразвуком, полученное методом трансмиссионной электронной микроскопии.

190 Фиг. 3. Рекомбинантные нанесённые на бетулиновые сферические наночастицы RBD-SD1-Fc белки. а) схематическое изображение комплекса бетулин/RBD-SD1-Fc, б) типичное изображение вириона SARS-CoV-2, в) хроматографический пик RBD-SD1-Fc перед нанесением на бетулиновые частицы, г) хроматограммы супернатанта после нанесения белка на частицы, подтверждающие абсорбцию антигена из раствора.

195 Фиг. 4. Схема S-белка SARS-CoV-2 и рекомбинантного белка на основе RBD-SD1-Fc. а) схема S-белка на поверхности SARS-CoV-2, б) схема структуры рекомбинантного RBD-SD1-Fc антигена, в) схема S-белка SARS-CoV-2, с указанной RBD-SD1 частью, взятой за основу рекомбинантных белков.

200 Фиг. 5. Экспрессионные кассеты четырех генных конструкций, кодирующих рекомбинантные белки на основе участка S-белка SARS-CoV-2, включающего RBD и SD1, слитых с Fc фрагментом IgG.

Фиг. 6. Линеаризованный pcDNA3.4 вектор для TOPO® TA клонирования продуктов ПЦР и для высокого уровня экспрессии.

Фиг. 7. Схема получения генных конструкция для экспрессии рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc.

205 Фиг. 8. Карта генной конструкции 83/1, содержащей сигнальный пептид S-белка, участок RBD (Ухань), и Fc фрагмент.

Фиг. 9. Карта генной конструкции 86/12, содержащей сигнальный пептид антитела F10, RBD-SD1 участок (Wuhan), и Fc фрагмент IgG.

210 Фиг. 10. Карта генной конструкции 78/9, содержащей сигнальный пептид S-белка, RBD-SD1 участок (Beta), и Fc фрагмент IgG.

Фиг. 11. Карта генной конструкции 85/1, содержащей сигнальный пептид антитела F10, RBD-SD1 участок (Beta), и Fc фрагмент IgG.

215 Фиг. 12. Общая схема экспрессионной кассеты, включающей последовательность сигнального пептида, RBD-SD1 участка SARS-CoV-2, линкерную последовательность, и Fc фрагмент IgG, организованной в формате модульной конструкции, позволяющей осуществлять модификации или замены участков согласно сайтам рестрикции.

220 Фиг. 13. Электрофореграмма разделения образцов рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc штаммов Wuhan и Beta в 10% ПААГ в восстанавливающих (+БМЭ) и невосстанавливающих условиях (-БМЭ). М – маркер молекулярных масс (15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 кДа).

Фиг. 14. Схема эксперимента по двукратной иммунизации BALB/C мышей с периодом в 2 недели.

Фиг. 15. Уровень специфических антител к белку mutant RBD-Fc в сыворотках иммунизированных мышей линии BALB/c после двукратной иммунизации вакцинными препаратами в дозе 5 мкг и 20мкг. Отдельные символы демонстрируют индивидуальное значение титра для каждого животного, горизонтальная черта – средне-геометрический титр для группы.

Фиг. 16. Уровень вирус-нейтрализующих антител к коронавирусу SARS-CoV-2 в сыворотках вакцинированных мышей BALB/c линии.

Отдельные символы демонстрируют индивидуальное значение титра для каждого животного, горизонтальная черта – средне-геометрический титр для группы.

Фиг. 17. Результаты изучения клеточного иммунного ответа – специфических ответов CD4+ и CD8+ Тем после иммунизации. (а) относительное присутствие вирус-специфичных CD4+ и CD8+ Тем среди CD4+/CD8+ CD44+ CD62L- спленоцитов, (б) относительная частота вирус-специфических цитокинов, продуцирующих CD4+ и CD8+ Тем.*p <0,05.

Перечень последовательностей.

Номера нуклеотидных последовательностей (SEQ ID NO) в тексте описания и формуле изобретения соответствуют таковым в Перечне последовательностей согласно стандарту ST.26, являющемуся частью настоящего описания изобретения:

- SEQ ID NO: 1 - pcDNA3.4 S-RBD(Wuhan)-Fc,
- SEQ ID NO: 2 - pcDNA3.4,
- SEQ ID NO: 3 - RBD-Fc AA (Wuhan),
- SEQ ID NO: 4 - Signal peptide, S-protein (NA),
- SEQ ID NO: 5 - RBD(Wuhan) NA
- SEQ ID NO: 6 - Fc NA,
- SEQ ID NO: 7 - pcDNA3.4 S-RBD(Beta)-Fc,
- SEQ ID NO: 8 - RBD-Fc AA (Beta),
- SEQ ID NO: 9 - RBD(Beta) NA,
- SEQ ID NO: 10 - Signal peptide, antibody F10 NA,
- SEQ ID NO: 11 - pcDNA3.4 F10-RBD(Wuhan)-Fc,
- SEQ ID NO: 12 - pcDNA3.4 F10-RBD(Beta)-Fc,
- SEQ ID NO: 13 - LSpF1,
- SEQ ID NO: 14 - LSpR1,
- SEQ ID NO: 15 - LSpF2,
- SEQ ID NO: 16 - LSpR2,
- SEQ ID NO: 17 - FclinkerF,
- SEQ ID NO: 18 - pcDNA3.4-R,

- 260 SEQ ID NO: 19 – Linker,
SEQ ID NO: 20 - pAL2-T, S-protein,
SEQ ID NO: 21 - pAL2-T, Fc,
SEQ ID NO: 22 - LidF10HF,
SEQ ID NO: 23 - LidF10HR1,
265 SEQ ID NO: 24 - LidF10HF2,
SEQ ID NO: 25 - LSpR2,
SEQ ID NO: 26 - pAL2-T, F10,
SEQ ID NO: 27 - S-RBD(Wuhan)-Fc NA,
SEQ ID NO: 28 - F10-RBD(Wuhan)-Fc NA,
270 SEQ ID NO: 29 - S-RBD(Beta)-Fc NA,
SEQ ID NO: 30 - F10-RBD(Beta)-Fc NA,
SEQ ID NO: 31 - S-RBD(Wuhan)-Fc,
SEQ ID NO: 32 - F10-RBD(Wuhan)-Fc,
SEQ ID NO: 33 - S-RBD(Beta)-Fc,
275 SEQ ID NO: 34 - F10-RBD(Beta)-Fc.

Осуществление изобретения.

Дизайн RBD-SD1-Fc экспрессионных кассет.

На первом этапе работы создана генная конструкция на основе вектора pCDNA3.4
280 (SEQ ID NO: 2), содержащего следующие участки: CMV промотор/энхансер, Start-End
(сайт клонирования для клонирования продуктов ПЦП), WPRE (посттранскрипционный
регуляторный элемент сурка), NeoR/KanR (ген устойчивости к неомицину/канамицину),
HSV TK poly(A) signal (сигнал полиаденилирования тимидинкиназы (TK) вируса простого
герпеса), f1 ori (сайт начала репликации), SV40 промотор и SV40 ori, SV40 poly(A) signal
285 (сигнал раннего полиаденилирования SV40), AmpR, AmpR promoter (ген устойчивости к
ампициллину (bla) (β -лактамаза) и его промотор), сайты рестрикции, обозначены
соответствующими им наименованиями. Экспрессионные кассеты клонируются в Start-
End положение.

Генная конструкция S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 1) включала экспрессионную
290 кассету, кодирующую рекомбинантный белок (SEQ ID NO: 3) на основе участка S-белка
штамма Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 (далее по тексту: Wuhan), включающего RBD и SD1,
слитого с Fc фрагментом IgG (фиг. 4б). Участок S-белка (аминокислоты 302-638),
включающий RBD и SD1 представлен на фиг. 4в как «RBD-SD1 антиген». Таким образом,
экспрессионная кассета включала три конструктивные последовательности:

- 295 (а) сигнальный пептид S-белка SARS CoV-2 (SEQ ID NO: 4),
(б) участок S-белка штамма Wuhan (SEQ ID NO: 5),

(в) Fc фрагмент IgG (SEQ ID NO: 6).

300 Дополнительно, в данном изобретении на основе полученной выше генной конструкции S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc создан вариант экспрессионной кассеты, где участок S-белка штамма Wuhan, включающий RBD и SD1, заменен на участок с мутациями (K417N, E484K, N501Y, D614G) штамма Beta, B.1.351 SARS-CoV-2 (далее по тексту: Beta). В результате, создана генная конструкция S-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 7), экспрессирующая рекомбинантный белок (SEQ ID NO: 8) на основе такого же участка S-белка штамма Beta (аминокислоты 302-638), включающего RBD и SD1, слитого с Fc
305 фрагментом IgG. Таким образом, генная конструкция включала три конструктивные последовательности:

(а) сигнальный пептид S-белка SARS CoV-2 (SEQ ID NO: 4),

(б) участок S-белка штамма Beta (SEQ ID NO: 9),

(в) Fc фрагмент IgG (SEQ ID NO: 6).

310 Сигнальные пептиды представляют собой последовательности, которые играют центральную роль в нацеливании и транслокации почти всех секретируемых белков и многих интегральных мембранных белков как у прокариот, так и у эукариот. От выбора сигнального пептида напрямую зависит секреция рекомбинантного белка. Для того, чтобы обеспечить высокие уровни продукции белка в культуральную среду, в данном
315 изобретении использована последовательность сигнального пептида S-белка SARS-CoV-2 по причине наличия участка S-белка SARS-CoV-2 в рекомбинантном белке. Также, по причине наличия Fc фрагмента IgG в рекомбинантном белке, последовательность сигнального пептида S-белка в двух ранее описанных генетических конструкциях S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc и S-RBD-SD1(Beta)-Fc, экспрессирующих участок S-белка штаммов
320 Wuhan и Beta, заменена на сигнальный пептид антитела F10 (SEQ ID NO: 10). Таким образом, созданы генетические конструкции F10-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 11) и F10-RBD-SD1-Fc (SEQ ID NO: 12), экспрессирующие рекомбинантные белки на основе участка S-белка штаммов Wuhan и Beta SARS-CoV-2, включающего RBD и SD1, слитых с Fc фрагментом IgG.

325 Fc фрагмент – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина, часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc рецепторами на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. Fc фрагмент димеризуется друг с другом посредством дисульфидных связей, образуя димер из идентичных половин, формируя Y-образную структуру. Связь с Fc фрагментом антигенных фрагментов имитирует таким
330 образом комплекс антиген-антитело, увеличивающий иммунный ответ, корректируя его в сторону специфического иммунного ответа и предотвращая IgE-связанную аллергенность. Также, связь с Fc фрагментом позволяет обеспечить аффинную очистку путем хроматографии через сорбент сефарозу с белком А в качестве лиганда, что

обеспечивает высокую чистоту конечного продукта после очистки.

335 Таким образом, с учетом использованных вариантов последовательностей сигнальных пептидов, S-белка SARS-CoV-2, и последовательности Fc фрагмента IgG, в конечном итоге были сконструированы четыре экспрессионные кассеты (табл. 1), экспрессирующие два рекомбинантных белка на основе участка S-белка штаммов Wuhan и Beta, которые схематично представлены на фиг. 5.

Таблица 1. Конструкции и экспрессионные кассеты для экспрессии рекомбинантных белков на основе участка S-белка SARS-CoV-2, включающего RBD и SD1, слитого с Fc фрагментом IgG.				
Конструкция pсDNA3.4	Экспрессионная кассета	Элементы экспрессионной кассеты		
		Сигнальный пептид	RBD - SD1	Fc
S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 1)	LidSpike – RBD-SD1(Wuhan) – Fc	S	Wuhan	Fc IgG
F10-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 11)	LidF10 – RBD-SD1(Wuhan) – Fc	F10	Wuhan	Fc IgG
S-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 7)	LidSpike – RBD-SD1(Beta) – Fc	S	Beta	Fc IgG
F10-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 12)	LidF10 – RBD-SD1(Beta) – Fc	F10	Beta	Fc IgG

340

Способ получения рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc.

Разработанный способ получения рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc включает следующие этапы:

- 1) Нарработку последовательностей сигнального пептида и Fc фрагмента IgG,
- 345 2) Получение рAL2-T генных конструкций, включающих последовательности сигнального пептида и Fc фрагмента IgG,
- 3) Лигирование фрагментов (последовательностей) сигнального пептида, Fc фрагмента IgG, и участка S-белка SARS-CoV-2 в pсDNA3.4 генную конструкцию,
- 4) Культивирование клеток для получения рекомбинантного белка на основе RBD-SD1-Fc,
- 350 5) Отбор культуральной среды,
- 6) Хроматографическую очистку рекомбинантного белка на основе RBD-SD1-Fc,
- 7) Подтверждение подлинности полученного рекомбинантного белка на основе RBD-SD1-Fc.

355 На первом этапе работы методом ПЦР синтезировали последовательности

сигнального пептида S-белка и Fc фрагмента IgG. Последовательность сигнального пептида S-белка синтезировали с помощью праймеров LSpF1-LSpR1 (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14) и LSpF2-LSpR2 (SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16). Последовательность Fc фрагмента синтезировали с помощью праймеров FclinkerF (SEQ NO ID: 17) и pcDNA3.4-
360 R (SEQ NO ID: 18) на основе плазмиды, содержащей ген Hc моноклонального антитела трастузумаб в качестве матрицы.

Отжиг праймеров осуществляли при 58 °C, количество циклов амплификации устанавливали равным 15. Фрагменты разделяли методом ДНК электрофореза в 1% агарозном геле, выделяли фрагменты размером 78 и 850 п.о., и клонировали отдельно
365 в T-вектор pAL2-T. В результате работы получили две pAL2-T генные конструкции, включающие последовательности сигнального белка S-белка, и полиглицин-серинового линкера (SEQ ID NO: 19), слитого с Fc фрагментом IgG, соответственно. Полученные последовательности подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Отобранные pAL2-T генные конструкции (SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21), несущие
370 последовательность сигнального пептида S-белка и последовательность полиглицин-серинового линкера, слитого с Fc фрагментом IgG, соответственно, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI, XhoI, HinDIII, выделяли фрагменты, и в ходе трёхкомпонентного лигирования клонировали в pcDNA3.4 (фиг. 6) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI, XhoI.

375 Генную конструкцию, включающую нуклеотидную последовательность участка S-белка штамма Wuhan (Wuhan-1, GenBankID:NC_045512 302:638) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и HinDIII, разделяли продукты реакции в 1% агарозном геле в ходе электрофореза, и выделяли фрагмент размером 1080 п.о. Выделенные фрагменты клонировали по сайтам BamHI и HinDIII в предварительно
380 подготовленную pcDNA3.4 генную конструкцию, несущую нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальный пептид S-белка и Fc фрагмент IgG. Таким образом, получена pcDNA3.4 S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc генная конструкция (SEQ ID NO: 1), содержащая экспрессионную кассету, кодирующую сигнальный пептид S-белка, участок S-белка штамма Wuhan, и Fc фрагмент IgG, которая может быть затем использована для
385 продукции RBD-SD1(Wuhan)-Fc рекомбинантного (SEQ ID NO: 3).

Для получения RBD-SD1-Fc рекомбинантного белка, содержащего участок S-белка штамма Beta (SEQ ID NO: 8), получали экспрессионную кассету, где участок, кодирующий S-белок, включающий RBD и SD1, заменен на участок с мутациями (K417N, E484K, N501Y, D614G). Генную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность
390 участка S-белка штамма Beta (SEQ ID NO: 9) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и HinDIII, разделяли продукты реакции в 1% агарозном геле в ходе электрофореза и выделяли фрагмент размером 1080 п.о. Выделенные фрагменты клонировали по

сайтам BamHI и HinDIII в предварительно подготовленную pсDNA3.4 генную конструкцию, несущую нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальный пептид S-белка, и Fc-фрагмент IgG. Таким образом получена pсDNA3.4 S-RBD-SD1(Beta)-Fc генная конструкция (SEQ ID NO: 7), включающая сигнальный пептид S-белка, участок S-белка штамма Beta, и Fc фрагмент IgG, которая может быть затем использована для продукции RBD-SD1(Beta)-Fc рекомбинантного белка (SEQ ID NO: 8).

Для проверки работы экспрессионной кассеты при замене сигнальной последовательности, на основании ранее полученных конструкций получали экспрессионные кассеты, кодирующие рекомбинантные белки RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 3) и RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 8), где произведена замена последовательности сигнального пептида S-белка, на последовательность сигнального пептида F10 анти-TNF иммуноглобулина (SEQ ID NO: 10).

Последовательность сигнального пептида F10 синтезировали с помощью праймеров LidF10HF1-LidF10HR1 (SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23) и LidF10HF2- LSpR2 (SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25). Отжиг праймеров осуществляли при 58°C, количество циклов амплификации устанавливали равным 15. Фрагменты разделяли методом ДНК электрофореза в 1% агарозном геле, выделяли фрагменты размером 84 п.о., и клонировали в T-вектор pAL2-T. Отобранную pAL2-T генную конструкцию (SEQ ID NO: 26), несущую последовательность сигнального пептида антитела F10, и ранее полученную pAL2-T конструкцию, несущую последовательность Fc фрагмента IgG (SEQ ID NO: 21) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI, XhoI, HinDIII, выделяли фрагменты и в ходе трёхкомпонентного лигирования клонировали в pсDNA3.4 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI, XhoI.

Генные конструкции pсDNA3.4, включающие нуклеотидные последовательности участка S-белка штаммов Wuhan и Beta, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и NheI, разделяли продукты реакции в 1% агарозном геле в ходе электрофореза и выделяли фрагменты размером 1080 п.о. Выделенные фрагменты клонировали по сайтам BamHI и HinDIII в предварительно подготовленные pсDNA3.4 генные конструкции, несущие последовательности, кодирующие сигнальный пептид F10 и Fc-фрагмент IgG. Таким образом получены генные конструкции pсDNA3.4 F10-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 11) и F10-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 12), которые могут быть затем использованы для продукции RBD-SD1(Wuhan)-Fc или RBD-SD1(Beta)-Fc рекомбинантных белков. Схема получения генной конструкции с вариантами экспрессионных кассет, кодирующих рекомбинантные белки на основе RBD-SD1-Fc представлена на фиг. 7. В результате работы получены генные конструкции 83/1 (фиг. 8), 86/12 (фиг. 9), 78/9 (фиг. 10), и 85/1 (фиг. 11). Данные генные конструкции включали следующие экспрессионные кассеты: S-RBD-SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 27), F10-RBD-

430 SD1(Wuhan)-Fc (SEQ ID NO: 28), S-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 29), F10-RBD-SD1(Beta)-Fc (SEQ ID NO: 30). Экспрессионные кассеты кодировали следующие рекомбинантные белки (с сигнальными последовательностями): SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. Общая схема экспрессионных кассет для продукции RBD-SD1-Fc рекомбинантных белков представлена на фиг. 12.

435 Данная модульная конструкция позволяет согласно принципу "LEGO Genetics" легко получать новые варианты рекомбинантных белков – антигенов против SARS-CoV-2 и его мутантных штаммов, а также повышать продуктивность экспрессионной системы и заменять в экспрессионной кассете помимо вышеперечисленных модификаций в общем виде также следующие:

440 1) Заменять участок, кодирующий S-белок SARS-CoV-2, включающий RBD и SD1, на альтернативные, в т.ч. мутантные и/или гомологичные, например против других вирусов с помощью обработки эндонуклеазами BamHI и HindIII и последующего лигирования.

445 2) Менять сигнальные последовательности для экспрессии рекомбинантного белка на альтернативные, в т.ч. с целью повышения продуктивности системы экспрессии или внесения дополнительных пост-трансляционных модификаций, с помощью обработки исходной экспрессионной кассеты эндонуклеазами NheI и HindIII и последующего лигирования.

450 3) Менять Fc фрагмент и линкер на альтернативные, например на Fc фрагменты других иммуноглобулинов, в т.ч. для изменения фармакокинетических характеристик получаемого антигена, с помощью обработки эндонуклеазами BamHI и XhoI и последующего лигирования.

455 4) Клонирования и вырезания генетической конструкции сигнальный пептид-RBD-SD1-Fc целиком, в т.ч. для замены промотора с помощью обработки исходной экспрессионной кассеты эндонуклеазами XhoI и NheI и последующего клонирования в другой вектор.

При этом, замены в экспрессионной кассете не должны быть менее 85%.

Клеточная культура для наработки рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc.

460 Полученные генные конструкции (83/1, 86/12, 78/9, 85/1) затем нарабатывали в препаративных количествах и очищали при помощи коммерческого набора Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген, кат. № BC124). Рекомбинантные белки RBD-SD1-Fc были получены на основе клеточной линии CHO-S и разработанных выше генных конструкций. Это коммерческая клеточная линия на основе клеток яичника китайского хомячка CHO, адаптированная к культивированию в плотной суспензии в специальной культуральной среде для повышенной экспрессии белка.

Клетки CHO-S культивировали в шейкер-инкубаторе при 5% содержания CO₂, 80%-ной влажности и скорости качания 120 об/мин в питательной среде HyClone HyCell TransFx-C transfection media (GE Healthcare, США) с добавлением 8 мМ глутамина (ПанЭко, Россия), до достижения плотности 2*10⁶ кл/мл 1 литр суспензии. Далее полученную суспензию трансфицировали плазмидными векторами 83/1, 86/12, 78/9, и 85/1 при помощи 1 мг/мл реагента Polyethylenimine (Polyscience, США), согласно инструкции производителя. В клетках CHO в режиме транзientной экспрессии осуществлен биосинтез рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc. Затем в течение 2 недель проводили селекцию трансфицированных клеток на антибиотике гигромицин Б. Данный антибиотик был выбран, поскольку плазмидные векторы содержат ген устойчивости к антибиотику Нугромусин В. Продукция указанного белка составляла от 5 мг/л до 10 мг/л.

Выделение рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc осуществляли из культуральной жидкости, по окончании культивирования клеток CHO. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин, супернатант переносили в чистые пробирки и осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин. Супернатант снова переносили в чистые пробирки, добавляли 1/10 объёма 10-кратного буфера Трис-HCl (20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl pH 7,2 1x буфер) и наносили на предварительно уравновешенную 1 мл колонку с носителем HiTrap MabSelect SuRe (Cytiva, США). Выделение белковых препаратов осуществляли на хроматографе Acta Pure (GE Healthcare, США) при скорости потока жидкости 2-4 мл/мин и давлении не более 0,5 Мпа. После нанесения колонку промывали 10 объемами колонки буфера Трис-HCl. Рекомбинантный белок RBD-SD1-Fc элюировали цитратным буфером (20 мМ лимонная кислота-NaOH, 200 мМ NaCl, pH 3,0), детекцию белков осуществляли в режиме реального времени по оптическому поглощению при 280 нм. Фракцию, содержащую искомый продукт, нейтрализовали добавлением 1/10 от объема фракции буфера для нейтрализации (1М Tris-HCl pH 8,0). Элюат диализовали против двух смен фосфатного буфера (10 мМ NaH₂PO₄, 1.7 мМ K₂HPO₄, 137 мМ NaCl, KCl 2.7 мМ pH=7.4) стерилизовали фильтрацией и хранили на +4 °С для кратковременного хранения (не более месяца) и -20 °С для длительного хранения.

Подтверждение подлинности.

По результатам электрофореграммы подвижность рекомбинантного белка RBD-SD1-Fc в восстанавливающих условиях (+БМЭ) соответствовала ≈60 кДа, что обусловлено его гликозилированием (масса аминокислотной последовательности без учета гликозилирования составляет около 64.5 кДа). При невосстанавливающих условиях (-БМЭ) молекулярная масса получаемого белка составила ≈120-130 кДа, что соответствует димерному состоянию RBD-SD1-Fc. Таким образом, при первичном анализе препарата были подтверждена его ожидаемая молекулярная масса как в

505 мономерном, так и в димерном состоянии. Результаты электрофореграммы представлены на фиг. 13.

Подготовка бетулина в качестве адъюванта и буферных растворов.

510 Для приготовления адъюванта использовали раствор бетулина в тетрагидрофуране (TGF) (ООО «Березовый мир», Россия). На первом этапе стерилизующая фильтрация проводилась через нейлоновую мембрану (NRG Pall N66 +) с диаметром пор 0,22 мкм. Для получения однородной дисперсии адъюванта и снижения концентрации TGF 1% раствор бетулина смешивали с 25-кратным объемом стерильного 0,05М раствора Трис буфера (рН 7,0-9,0). Суспензию обрабатывали ультразвуком (35–40 кГц) в течение 10 мин.

515 **Подготовка антигенных композиций на основе рекомбинантного белка RBD-SD1-Fc и бетулина в буферном растворе.**

520 Рекомбинантный белок RBD-SD1-Fc и предварительно приготовленный адъювант в 0,05М буферном растворе Трис-НСl с добавлением 0,15М NaCl (рН 7,5) смешивали так, чтобы конечная концентрация антигена составлял 40 мкг/мл или 10 мкг/мл, а адъювант - 400 мкг/мл. Компоненты тщательно перемешали и поместили в шейкер в холодильник на 3 часа. Затем флаконы с RBD-SD1-Fc и адъювантом хранили в холодильнике при 2-8 °С.

Изучение иммуногенных свойств (титра антител) разработанных антигенных композиций на основе рекомбинантного белка RBD-SD1-Fc в различные сроки после иммунизации.

525 В исследовании были использованы самки линии BALB/c (Филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Количество животных, использованных в исследовании, являлось достаточным для того, чтобы оценить иммуногенность исследуемых объектов, а также позволило подвергнуть результаты исследования статистической обработке. Одновременно количество животных было минимальным с точки зрения этических принципов. Животных содержали в стандартных условиях (табл. 2), в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51).

Таблица 2. Условия содержания мышей в ходе исследования специфической активности вакцинных препаратов	
Система размещения:	Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды
Температура/ влажность/:	18-22°C и относительной влажности воздуха 50-70%
Уровень аммиака и углекислого газа:	NH ₃ =0,001 мг/м ³ , CO ₂ =0,1%.
Режим воздухообмена:	10-15 объемов помещения в час
Световой режим:	12 ч темноты/12 ч света
Клетки:	В период акклиматизации и эксперимента мышей размещали в автоклавируемых поликарбонатных клетках BENEX а.с. (Чешская республика), тип Т3А, S=800 см ² , группами по 10-12 особей, на подстиле; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила ≥ 60 см ²
Размещение:	В ходе эксперимента использовали групповое размещение по 12 животных в клетке
Подстил:	В качестве подстила использовали древесные гранулы Lignocell Wood Fibers (JRC, Германия)
Корм:	Гранулированный полнорационный экструдированный корм для мышей, крыс, хомяков (ООО «Лабораторкорм», Москва), давали <i>ad libitum</i> в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки
Вода:	Животным давали воду, очищенную и нормированную по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Животным давали воду в стандартных поилках со стальными крышками-носиками давали <i>ad libitum</i>

540

В табл. 3 приведены препараты на основе рекомбинантных белков RBD-SD1-Fc для иммунизации животных и дизайн исследования. В качестве препарата плацебо использовали физиологический раствор (0,9% NaCl) (Медполимер, Россия).

Таблица 3. Исследуемые антигенные композиции и дизайн исследования по оценке иммуногенности у мышей линии BALB/c.					
Антигенная композиция	Концентрация	Кол-во мышей	Наблюдения и манипуляции по дням		
			День 1	День 14	День 28
RBD1 (RBD-SD1(Wuhan)-Fc)	10 мкг/мл 40 мкг/мл	10	И1	И2	С
RBD2 (RBD-SD1(Beta)-Fc)	10 мкг/мл 40 мкг/мл	10	И1	И2	С
контроль	Физиологический раствор	10	И1	И2	С

Примечание: И – иммунизация, С – забор образцов сыворотки

545 Мышам линии BALB/c массой 18-20 г препараты вводили внутривенно по 0,5 мл шприцем вместимостью 1 мл, двукратно, 1-й и 14-й день, согласно дизайну исследования (фиг. 14). Перед каждым заполнением шприца препарат перемешивали 5-6 раз. Контрольной группе мышей той же партии вводили раствор 0,9 % натрия хлорида.

550 Через 28 дней после первой иммунизации у мышей осуществляли забор крови из нижнечелюстной вены. Образцы крови отстаивали при комнатной температуре в течение 2-х часов, центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин и отбирали образовавшуюся цельную сыворотку. До момента использования сыворотки хранили при температуре – 20 °С. Полученные из крови мышей сыворотки (индивидуально от каждого животного) контролировали на наличие антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) и РМН.

555 Статистический анализ первичных данных проводили в GraphPad Prism v9. Для представления данных использовали следующие статистические показатели: среднее геометрическое, стандартное отклонение, среднее арифметическое, ошибка среднего. Для определения значимости различий между групповыми средними использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, затем критерий Тьюки для апостериорных попарных сравнений групп между собой. Групповой уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали достоверными при $p < \alpha$.

Имуноферментный анализ.

565 Наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) определяли в образцах сывороток мышей после двукратной иммунизации. В качестве антигена использовали белок (SARS-CoV-2; mutant RBD-Fc Lot:2452-139-066 2.95mg/ml (0.22mkm Filt) Gly/TRIS/HCl pH 7.4), предоставленный для исследования. Сорбцию антигена,

разведенного в стерильном DPBS до концентрации 1,0 мкг/мл проводили в течение ночи при +4 °С в 96-луночных планшетах Maxisorp (Nunc) (по 100 мкл/лунку). Затем планшеты дважды отмывали раствором 0,1% TWEEN20 (Serva) в PBS с использованием автоматического промывателя ELx50 (BioTek) по 500 мкл/лунку. После отмывки планшеты инкубировали с блокирующим буфером (PBS-T, содержащий 5 % сухое молоко, «ТФ Дитол»), в течение 2-х часов при комнатной температуре и повторно отмывали. После чего на планшет вносили серии двукратных разведений сывороток, начиная с разведения 1:400 для групп животных, получивших вакцинные препараты и с разведения 1:50 для группы плацебо. Планшеты с мышиными сыворотками инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем три раза отмывали. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP (Abcam) в разведении 1:7500 по 100 мкл/лунку. После инкубации со вторичными антителами планшеты четыре раза отмывали. В качестве цветного субстрата использовали раствор TMB (ООО «Имтек», Россия) по 100 мкл/лунку в течение 10 мин при комнатной температуре, затем реакцию останавливали добавлением 1N H₂SO₄ («Вектон», Россия). Оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF монохроматорами CLARIOstar (BMG LABTECH).

Для четырех вакцинных препаратов после двукратной иммунизации в дозе 5 мкг и 20мкг было проведено определение уровня специфических антител к белку mutant RBD-Fc IgG в сыворотках иммунизированных животных с помощью непрямого варианта ИФА с использованием экспериментальной тест системы. Результаты определения уровня специфических антител представлены на фиг. 15. Статистический анализ был выполнен при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Тьюки.

В ходе исследования показано формирование выраженного уровня сывороточных антител, специфических к белку mutant RBD-Fc после двукратной иммунизации обоими вакцинными препаратами в обоих использованных дозах.

Реакция микронеutralизации.

Для проведения реакции нейтрализации сыворотки мышей разводили стерильным DPBS в соотношении 1:4 и прогревали 30 мин при 56 °С. Затем готовили разведения сывороток на среде MEM+2 % FBS в объеме 50 мкл, начиная с 1:10 (в пересчете на цельную сыворотку). К разведениям сывороток добавляли эквивалентный объем вируса SARS-CoV-2 (заражающая доза 25 ТЦИД₅₀) и инкубировали 1 час при 37 °С. Затем разведения переносили на клетки Vero в 96-луночных планшетах. Планшеты инкубировали в течение 4 суток при 37 °С, после чего проверяли на наличие ЦПД. Нейтрализующим титром считали наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отсутствие ЦПД. Все исследования с инфекционным коронавирусом

605 проводили в лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций ФГБНУ «ИЭМ» (Санитарно-эпидемиологическое заключение Роспотребнадзора по Санкт-Петербургу № 77.ПЧ.01.000.М.000053.08.20 от 05.08.2020 для проведения работ с ПБА II-IV группы патогенности).

610 Результаты определения уровня нейтрализующих антител против коронавируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови мышей после двукратной иммунизации показали, что вирус-нейтрализующие антитела в количестве, достоверно отличающимся от группы плацебо, формируются только в группе животных, получивших антигенную композицию, содержащую рекомбинантный белок RBD-SD1-Fc штамма Ухань в дозе 20мкг. Уровень вирус-нейтрализующих антител, сформировавшихся в других экспериментальных группах, достоверно не отличался от такового в группы плацебо. Результаты 615 представлены на фиг. 16. Статистический анализ был выполнен при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Тьюки.

620 В ходе исследования показано, что двукратная иммунизация приводила к формированию вирус-нейтрализующих антител в количестве достоверно отличающемся от группы плацебо только в группе животных, получивших антигенную композицию, содержащую рекомбинантный белок RBD-SD1-Fc штамма Ухань в дозе 20 мкг.

Изучение иммуногенных свойств (оценки клеточного иммунного ответа) разработанных антигенных композиций на основе рекомбинантного белка RBD-SD1-Fc в различные сроки после иммунизации.

625 Для оценки Т-клеточного иммунного ответа, мышам линии C57/black SPF (n=5 на группу) препарат RBD1 вводили внутрибрюшинно по 5 или 20 мкг, двукратно, 1-й и 22-й день. Селезенки были собраны через 28 дней после второй иммунизации. Невакцинированная группа (n=3) служила контролем. Дизайн исследования представлен в табл. 4.

Таблица 4. Исследуемая антигенная композиция и дизайн исследования по оценке иммуногенности у мышей линии BALB/c.					
Антигенная композиция	Концентрация	Кол-во мышей	Наблюдения и манипуляции по дням		
			День 1	День 22	День 28
RBD1	10 мкг/мл	10	И1	И2	С
RBD-SD1(Wuhan)-Fc	40 мкг/мл				
контроль	Физиологический раствор	3	И1	И2	С
Примечание: И – иммунизация, С – забор образцов селезенки					

630

Гомогенаты селезенки фильтровали (поры 70 мкм), промывали DPBS, содержащим 2,5% FCS (Gibco), лишали красных кровяных телец буфером для лизиса RBC (BioLegend), промывали DPBS (2,5% FCS). Клетки селезенки высевали на 96-луночные планшеты с плоским дном при плотности 2×10^6 клеток и стимулировали пулом пептида S-белка SARS-CoV-2 (PepTivator® SARS-CoV-2 Prot S) в течение 6 часов в присутствии анти-CD28 (BioLegend) и Брефельдина А (BD Biosciences). Фенотип клеток изучали с помощью проточной цитометрии и CD8-PE / Cy7, CD4-PerCP / Cy5.5, CD44-BV510, CD62L-APC / Cy7, IFN γ -BV780, TNF α -BV421, IL2-PE (BioLegend). Мертвые клетки обнаруживали с помощью Zombie Red (BioLegend). True Stain, содержащий анти-CD16/CD32 (Bio-Legend), использовали для блокирования неспецифического связывания. Окрашивание клеток проводили с помощью Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями.

Определяли относительное соотношение CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов с фенотипом эффекторных клеток памяти (CD44⁺ CD62L⁻). Значительное увеличение S-белок специфических CD4⁺ и CD8⁺ Тем клеток было измерено после двух иммунизаций по 20 мкг, тогда как иммунизация в количестве 5 мкг антигена привела к статистически значимому увеличению только CD4⁺ Тем ($p < 0,05$). Наблюдалась тенденция к дозозависимому росту клеток, продуцирующих Th1-цитокин (IFN γ , IL-2, TNF α), среди обеих популяций Тем. Эффект достиг значимости для Тем, продуцирующего IL-2 (IFN γ -IL-2 + TNF α -), и для многофункциональных CD8⁺ Т-клеток (IFN γ + IL-2 + TNF α +) в обеих группах дозирования. В группе с высокими дозами рост IL-2, продуцируемого CD8⁺ Тем, также был значительным (фиг. 17).

655

Формула изобретения

1. Антиген для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2, представляющий собой рекомбинантный белок, включающий участок S-белка вируса SARS-CoV-2, состоящий из аминокислотных остатков 302-638 доменов RBD и SD1, слитый с Fc фрагментом IgG посредством полиглицин-серинового линкера.

2. Антиген по п.1, в котором полиглицин-сериновый линкер имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.

3. Антиген по п.1, имеющий последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

4. Антиген п.1, имеющий последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

5. Антигенная композиция для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2, содержащая антиген по любому из пунктов 1-4, буферный раствор и адъювант, где в качестве адъюванта используется корпускулярный адъювант на основе тритерпеноидов из бересты бетулин.

6. Применение антигенной композиции по п.5 для индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

7. Применение по п.6, в котором антигенную композицию вводят внутримышечно.

8. Применение по п.6, в котором индукцией иммунитета является индукция антительного и клеточного иммунитета.

9. Генная конструкция для экспрессии рекомбинантного белка, включающего участок S-белка вируса SARS-CoV-2, состоящего из аминокислотных остатков 302-638 доменов RBD и SD1, слитого с Fc фрагментом IgG посредством полиглицин-серинового линкера, включающая экспрессионную кассету, состоящую из участков, кодирующих:

- сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2 или сигнальный пептид антитела F10 анти-TNF иммуноглобулина,
- участок с 302 по 638 аминокислотных остатков S-белка RBD-SD1 вируса SARS-CoV-2,
- полиглицин-сериновый линкер,
- Fc фрагмент IgG.

10. Генная конструкция по п.9, в которой кодирующая последовательность сигнального пептида S-белка SARS-CoV-2 представлена SEQ ID NO: 4.

11. Генная конструкция по п.9, в которой кодирующая последовательность сигнального пептида антитела F10 анти-TNF иммуноглобулина представлена SEQ ID NO: 10.

12. Генная конструкция по п.9, в которой кодирующая последовательность участка S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 5.

13. Генная конструкция по п.9, в которой кодирующая последовательность участка S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 9.

14. Генная конструкция по п.9, в которой полиглицин-сериновый линкер имеет

последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.

15. Генная конструкция по п.9, в которой кодирующая последовательность Fc фрагмента IgG представлена SEQ ID NO: 6.

16. Генная конструкция по п.9, содержащая экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 27.

17. Генная конструкция по п.9, содержащая экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 29.

18. Генная конструкция по п.9, содержащая экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 28.

19. Генная конструкция по п.9, содержащая экспрессионную кассету, представленную последовательностью SEQ ID NO: 30.

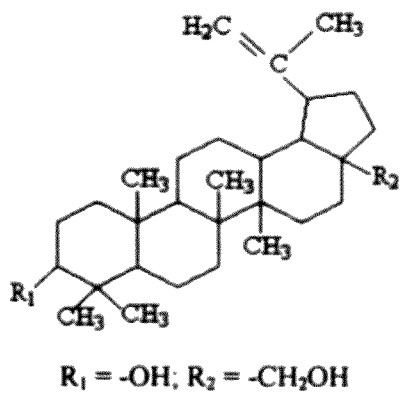
20. Способ получения рекомбинантного белка - антигена для индукции иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по любому из п.п.1-4, включающий:

- трансфекцию клеток яичника китайского хомячка CHO-S генной конструкцией по любому из пунктов 9-19;
- культивирование трансфицированных клеток яичника китайского хомячка CHO-S;
- отбор культуральной среды;
- хроматографическую очистку полученного рекомбинантного белка;
- подтверждение подлинности полученного рекомбинантного белка.

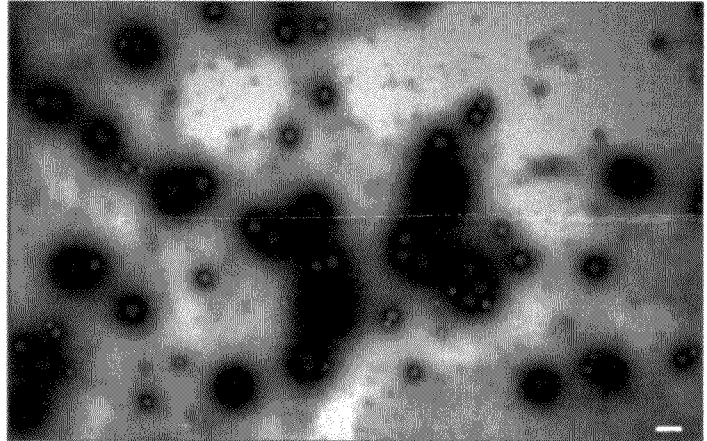
21. Способ получения по п.20, в котором рекомбинантный белок имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 3.

22. Способ получения по п.20, в котором рекомбинантный белок имеет последовательность, представленную SEQ ID NO: 8.

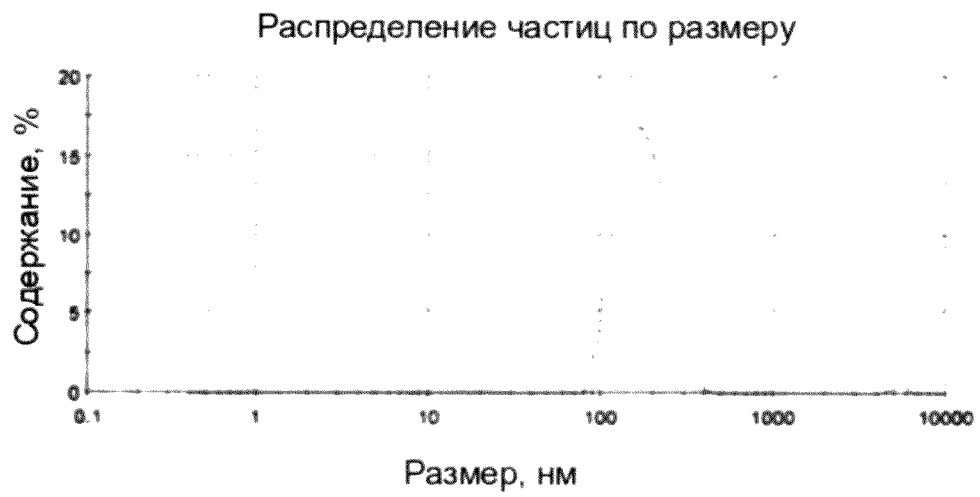
A



Б



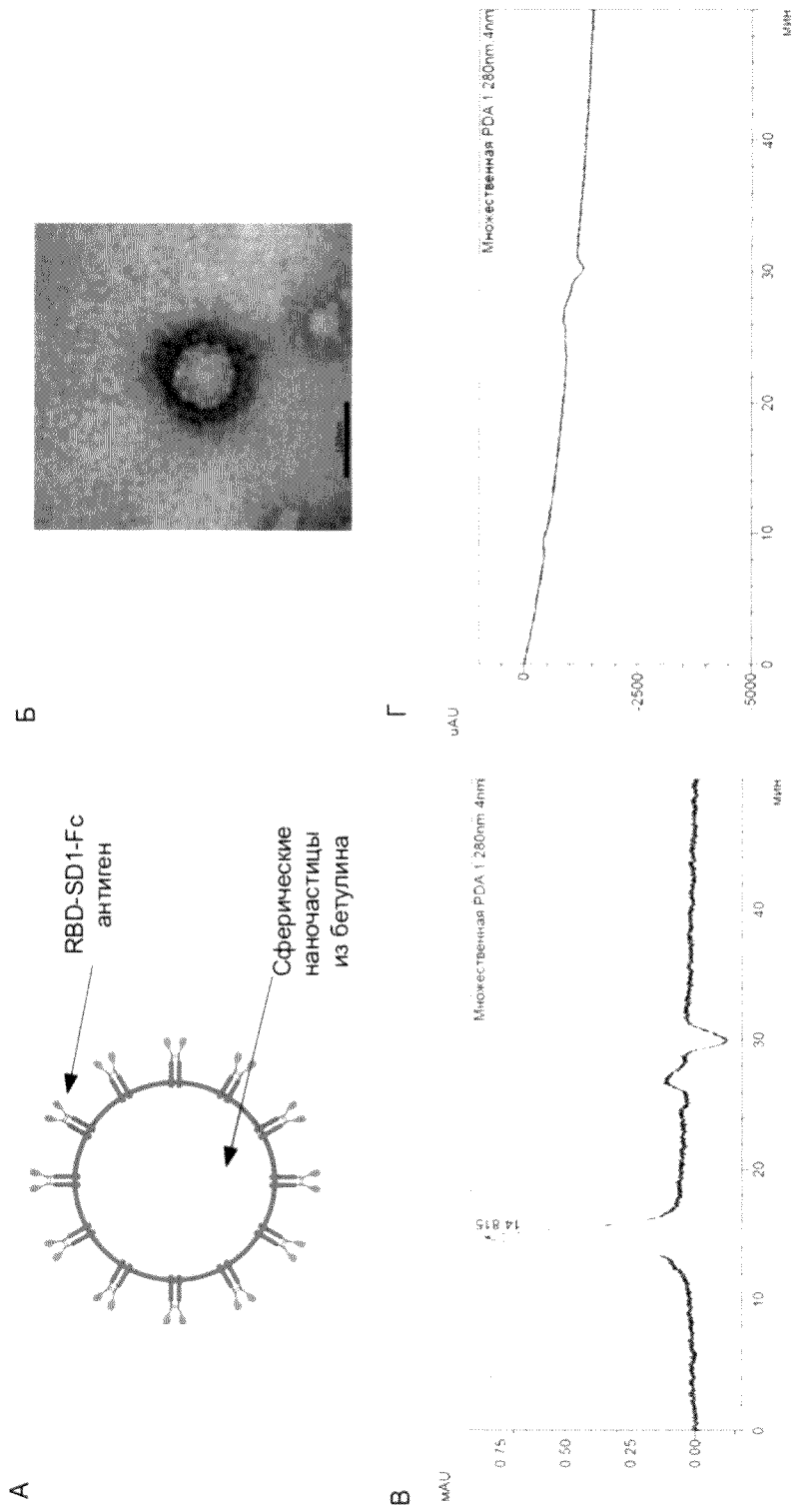
В



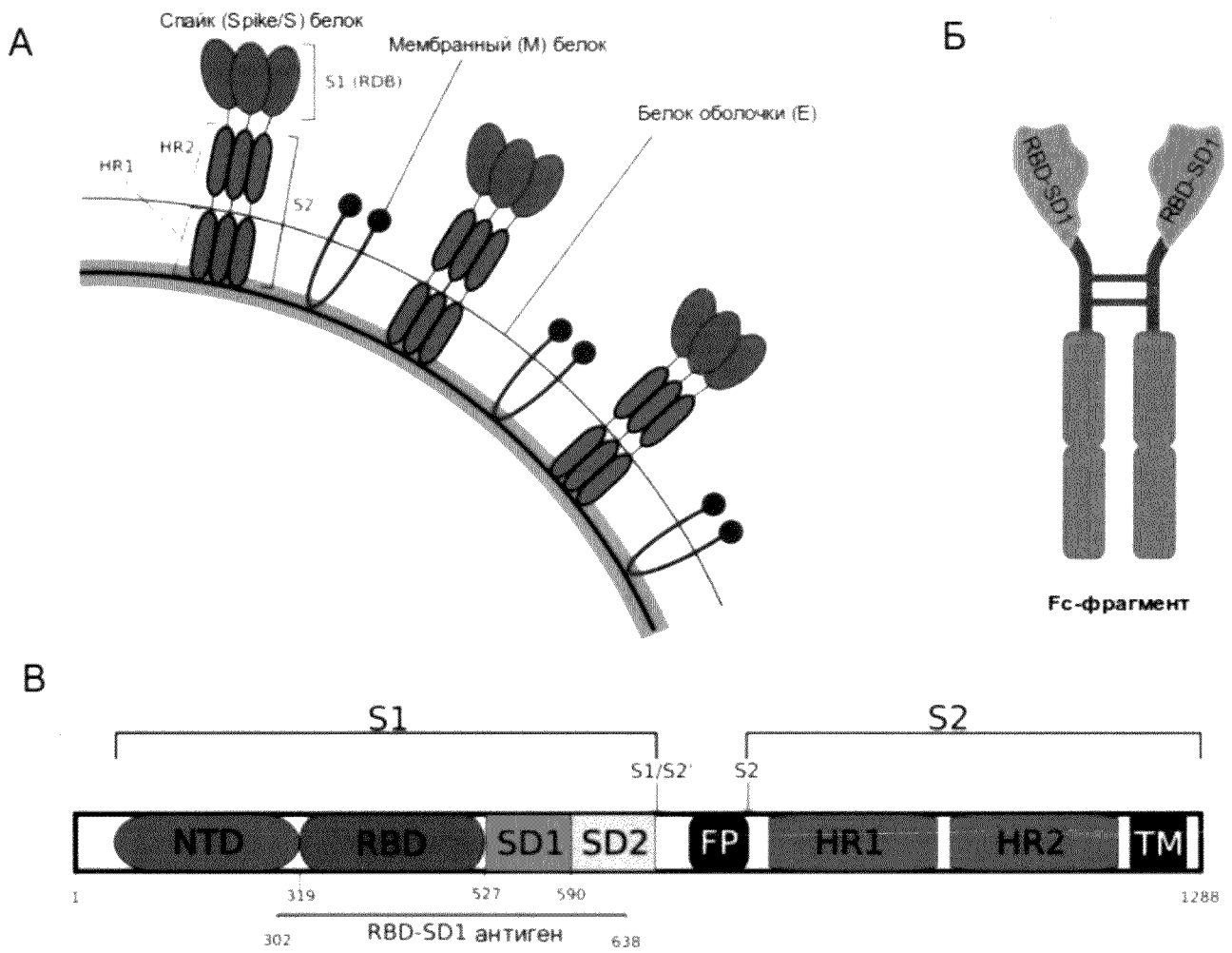
Фиг. 1



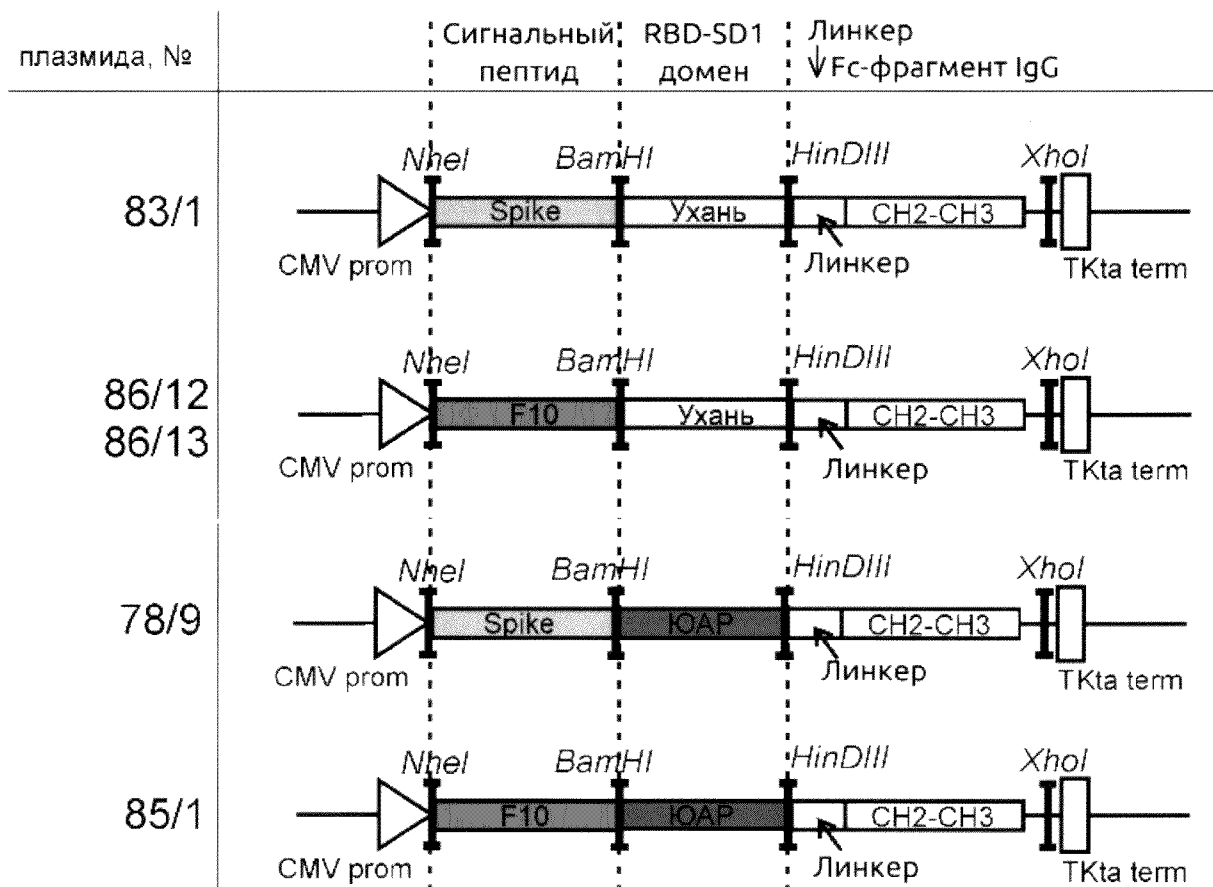
Фиг. 2



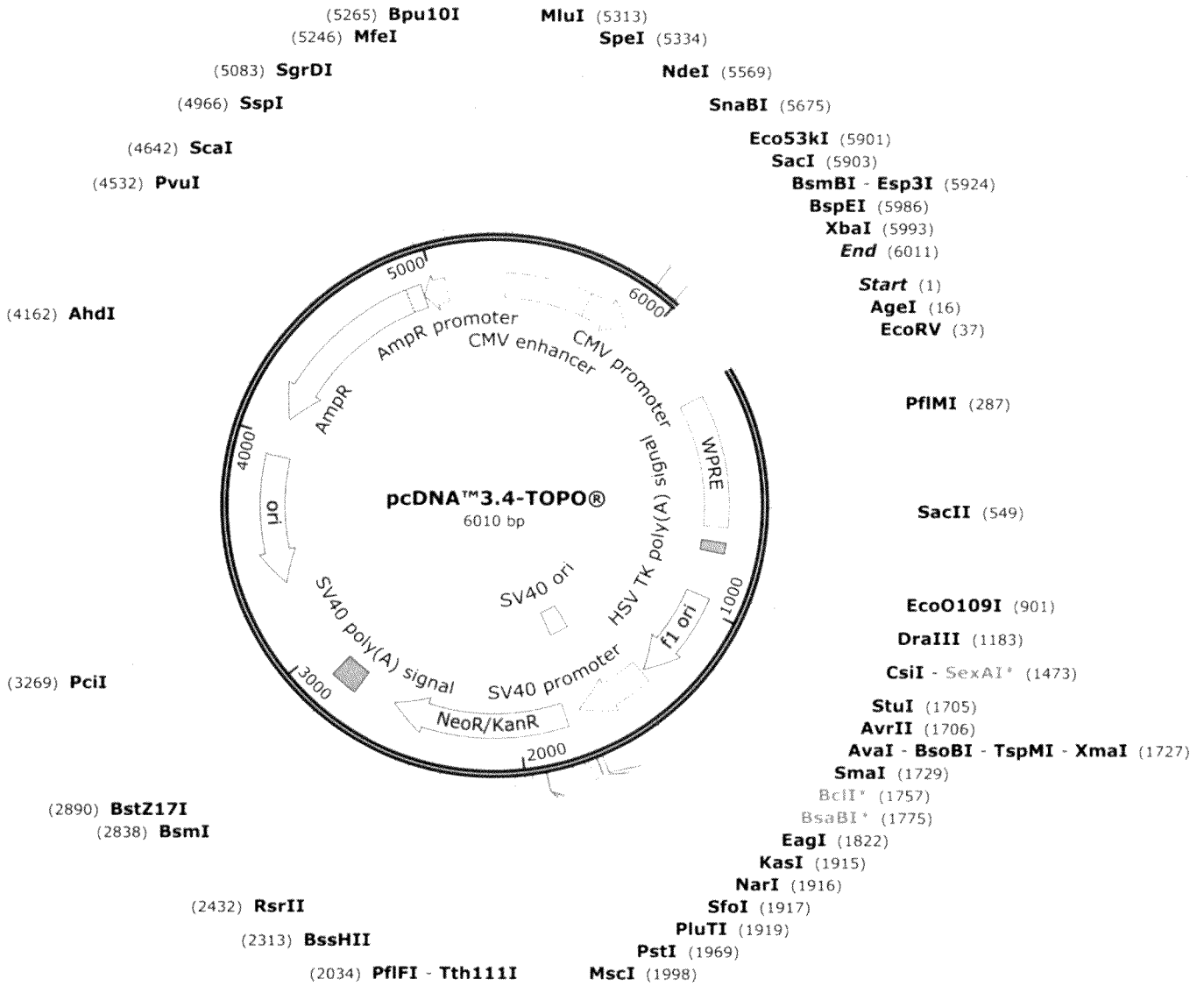
Фиг. 3



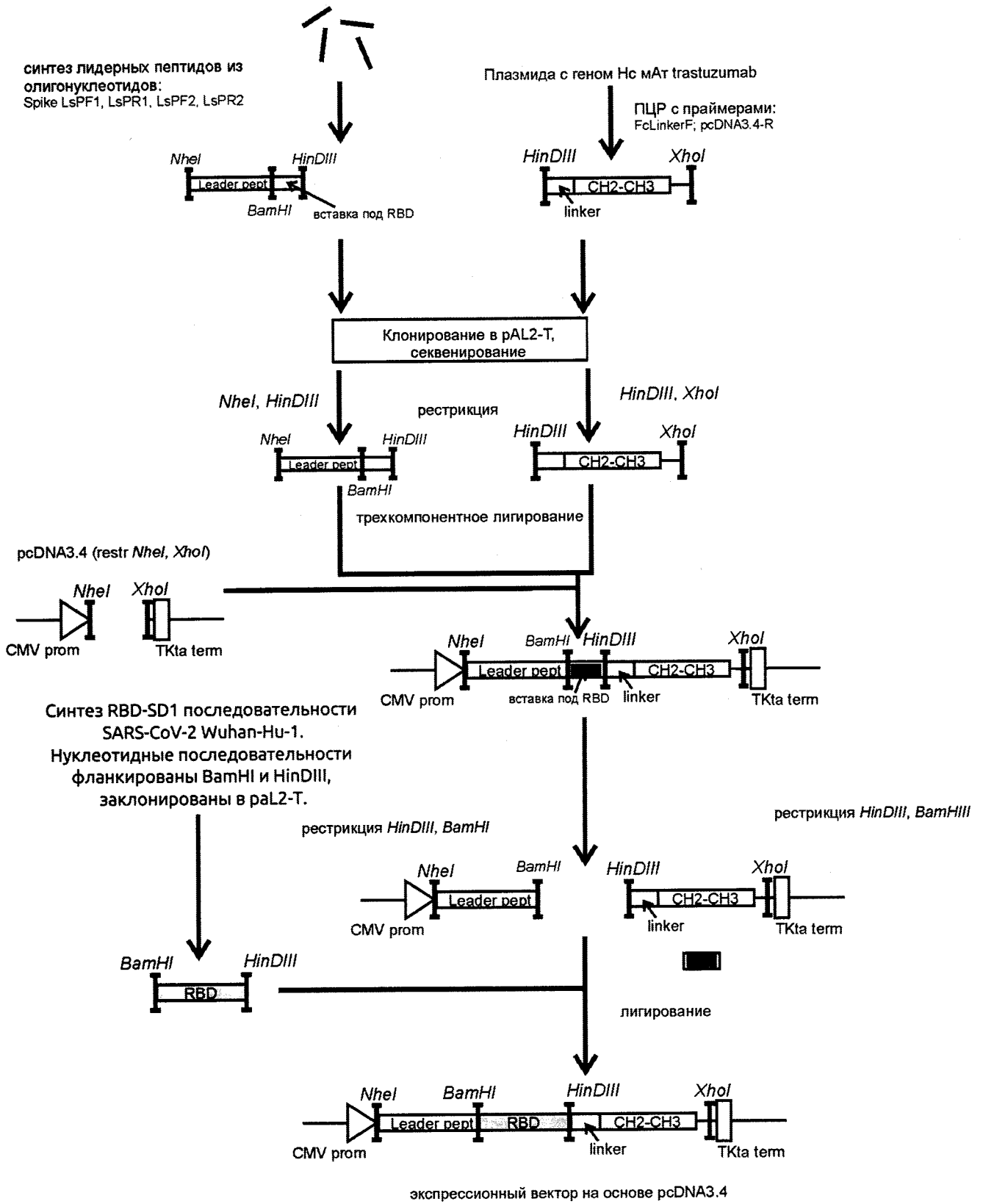
Фиг. 4



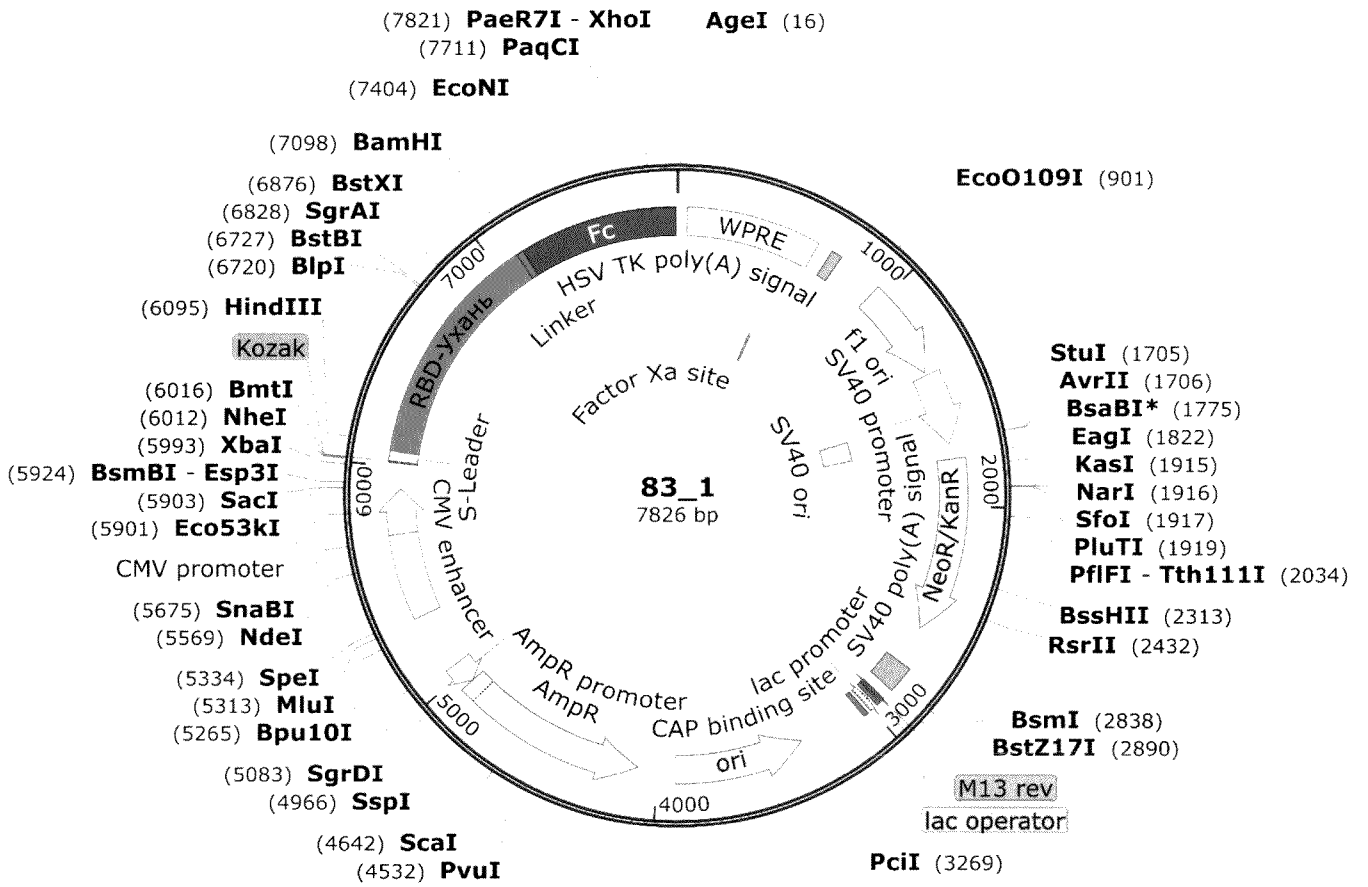
Фиг. 5



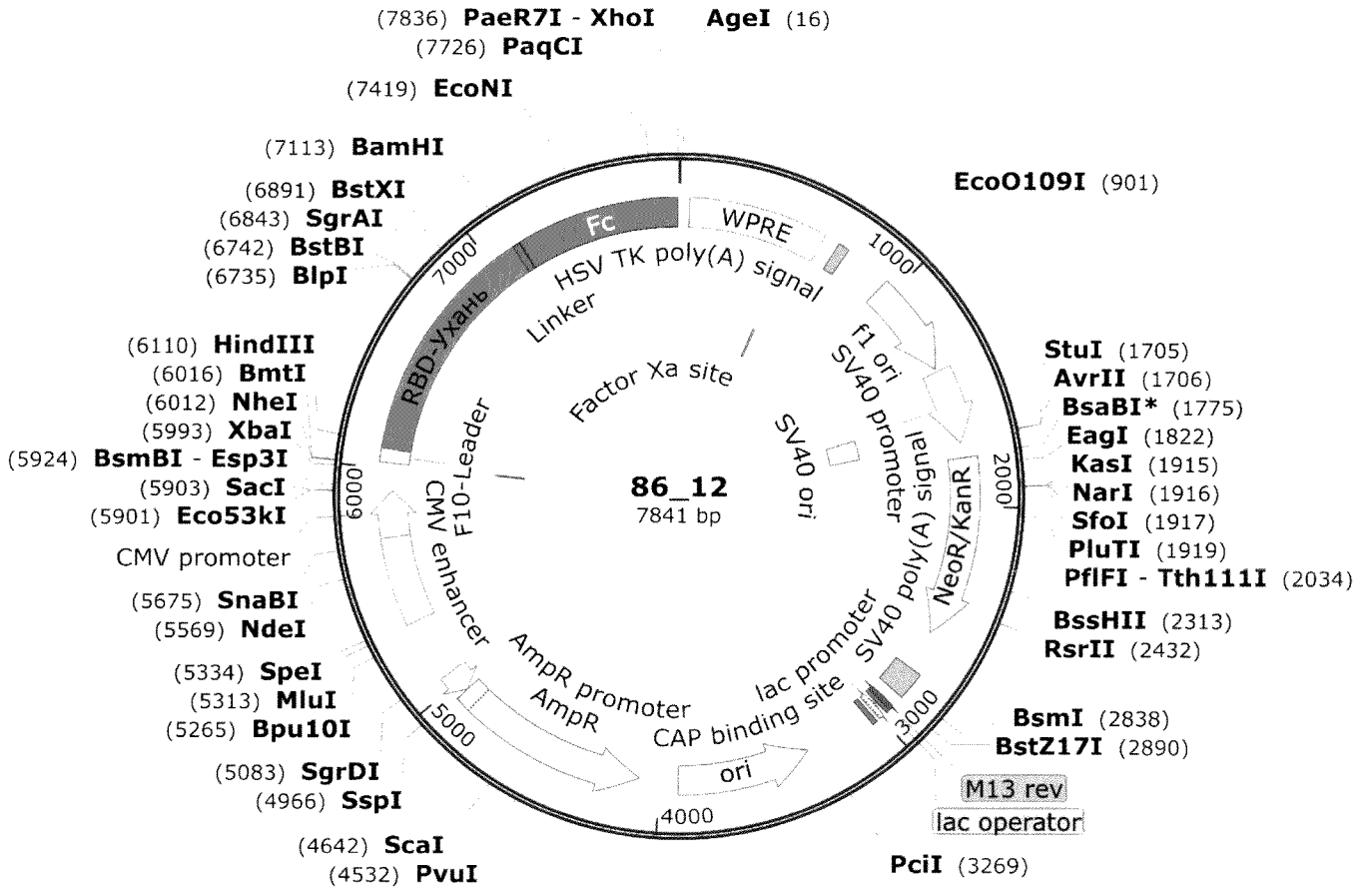
Фиг. 6



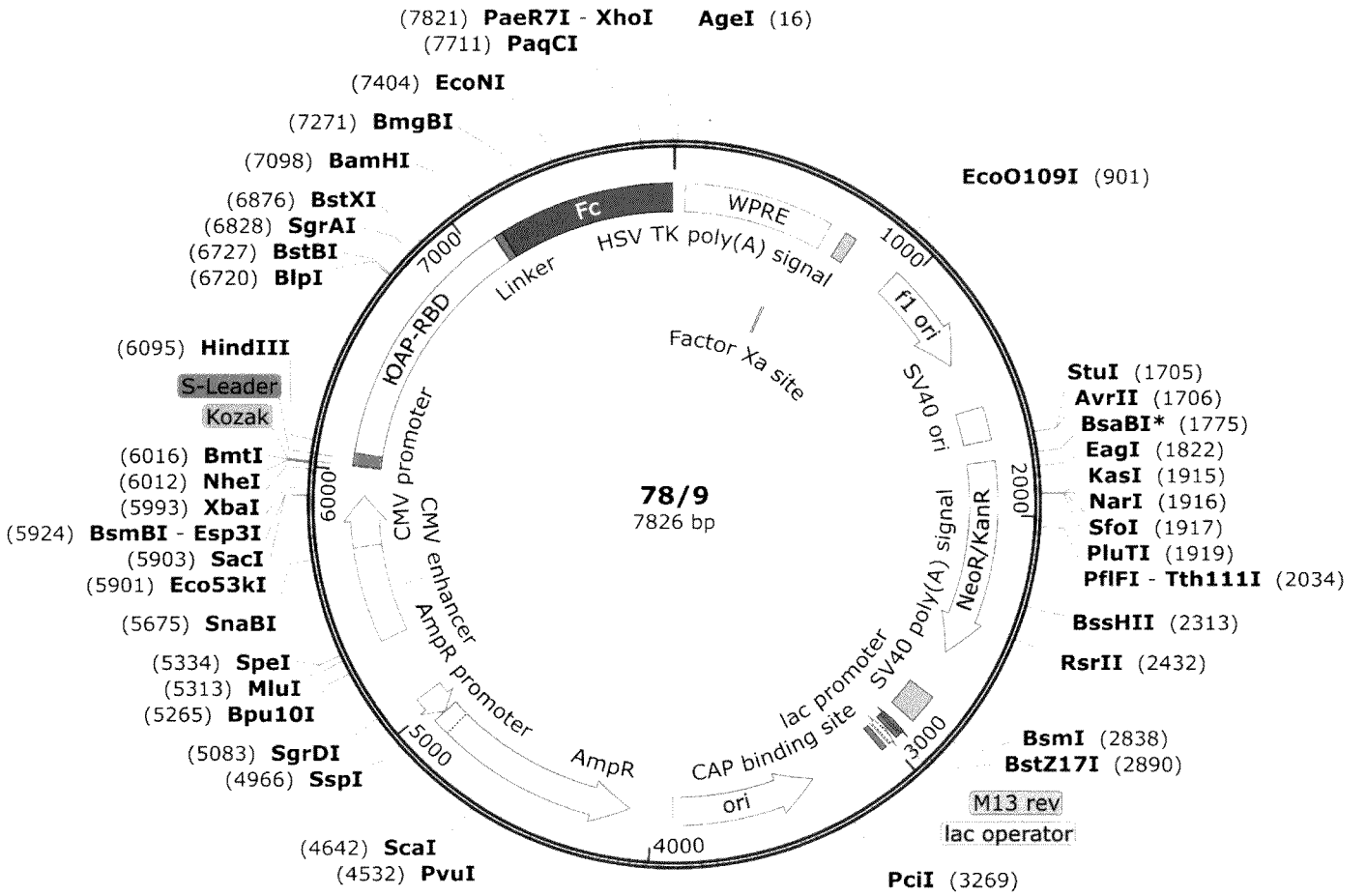
Фиг. 7



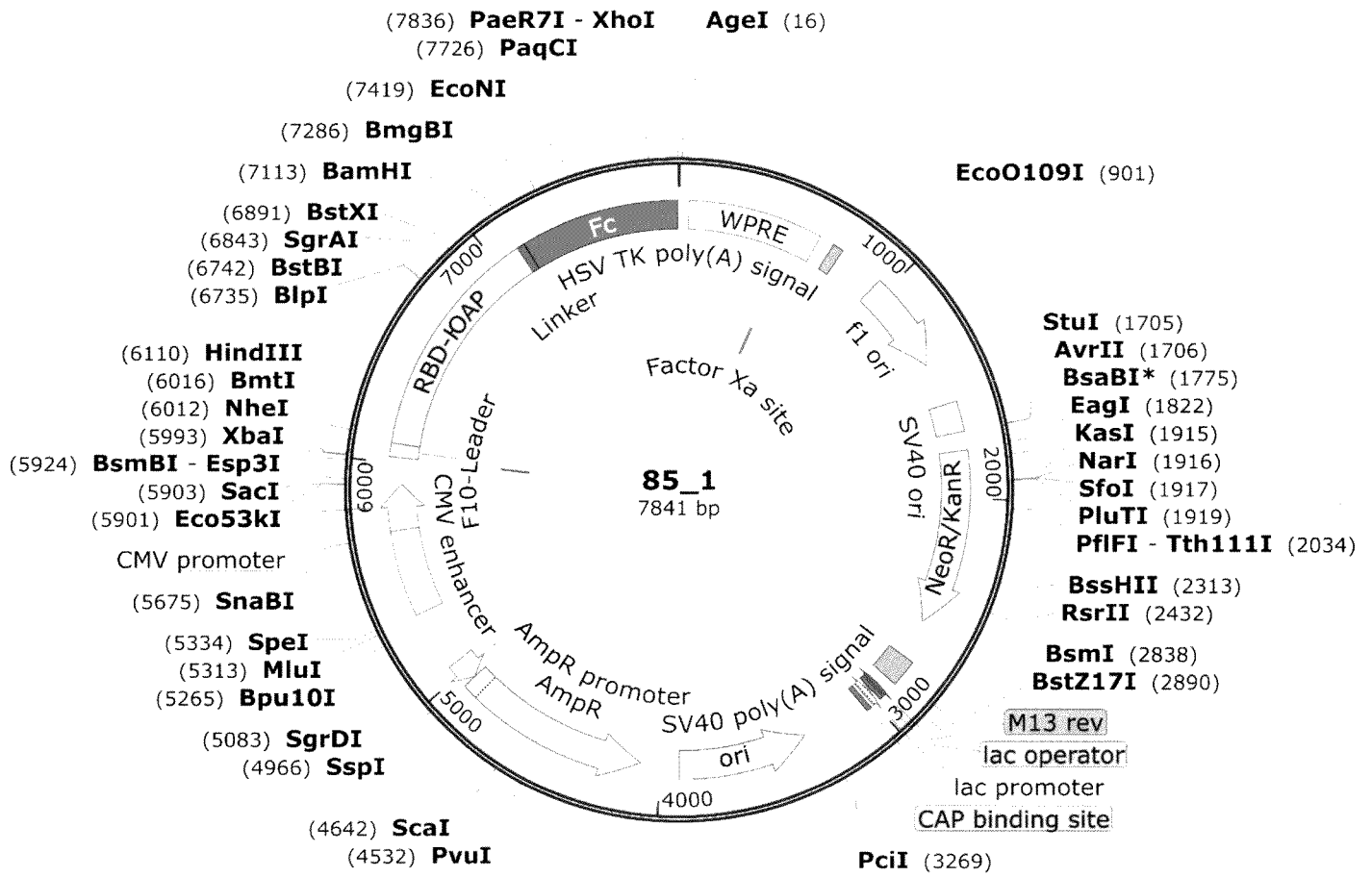
Фиг. 8



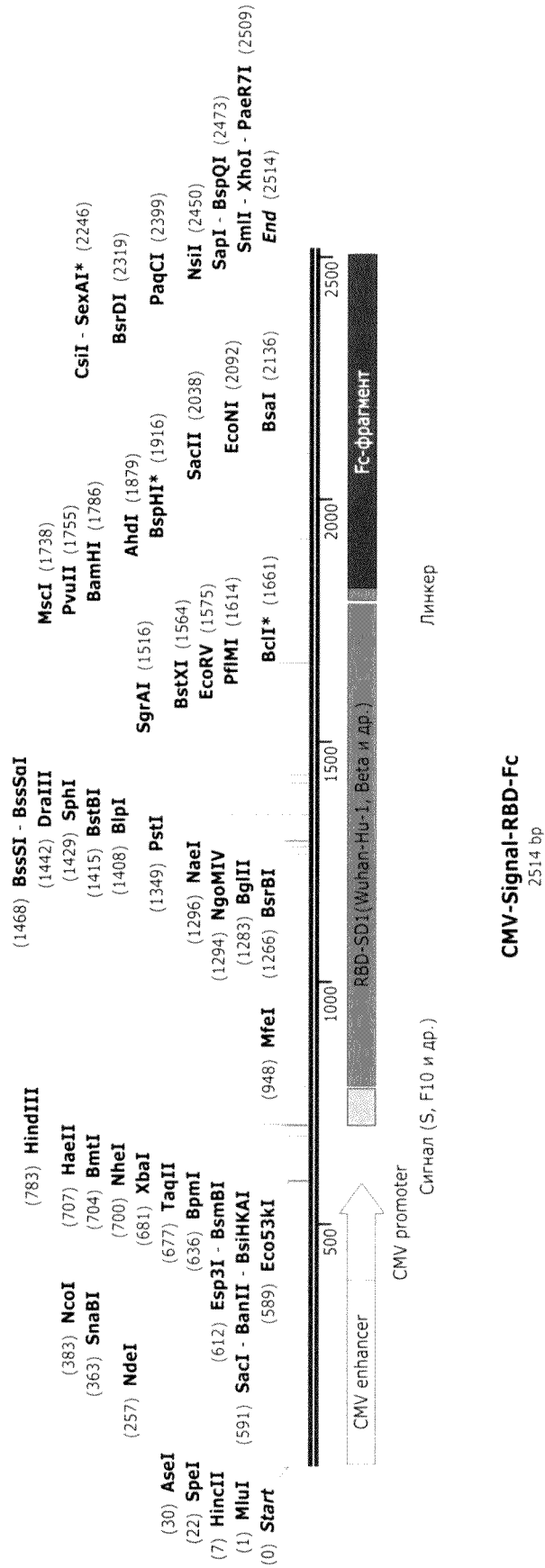
Фиг. 9



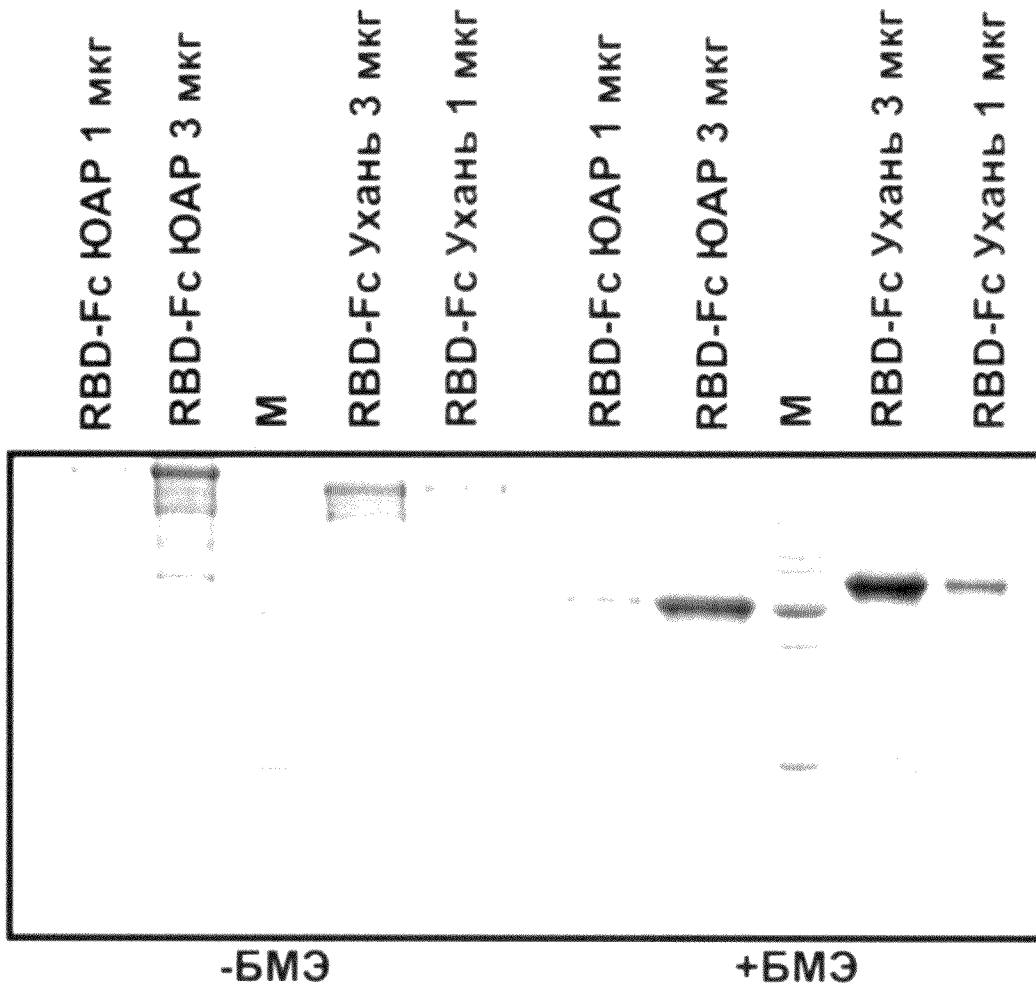
Фиг. 10



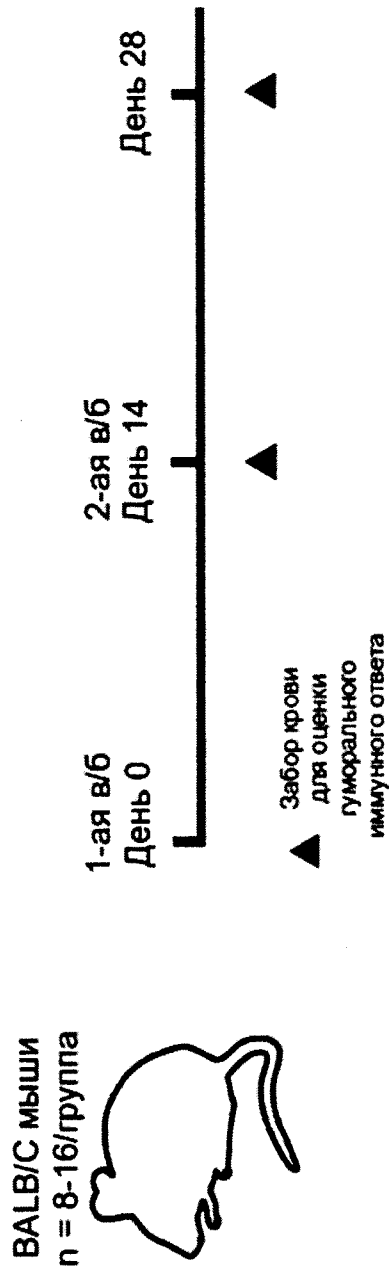
Фиг. 11



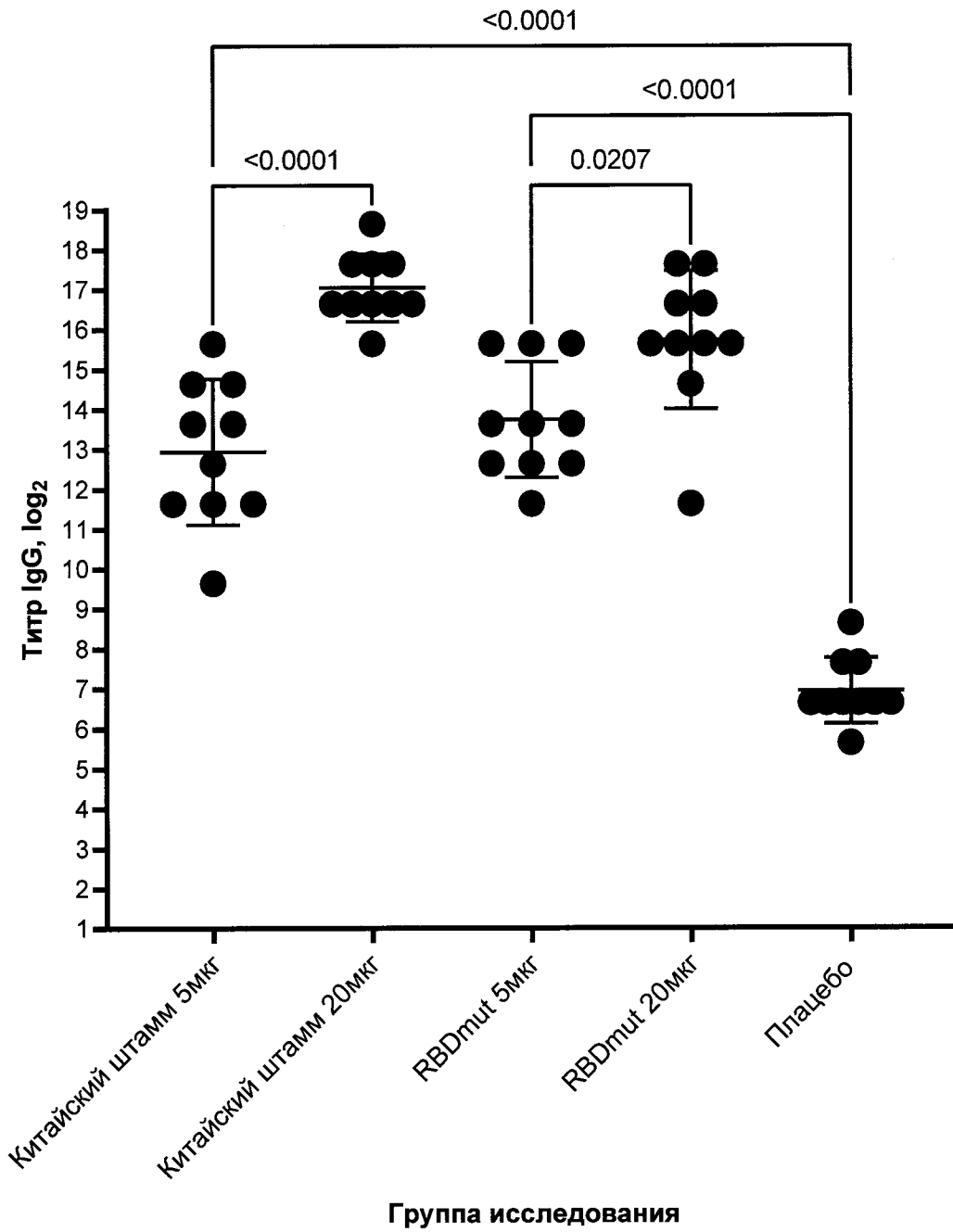
Фиг. 12



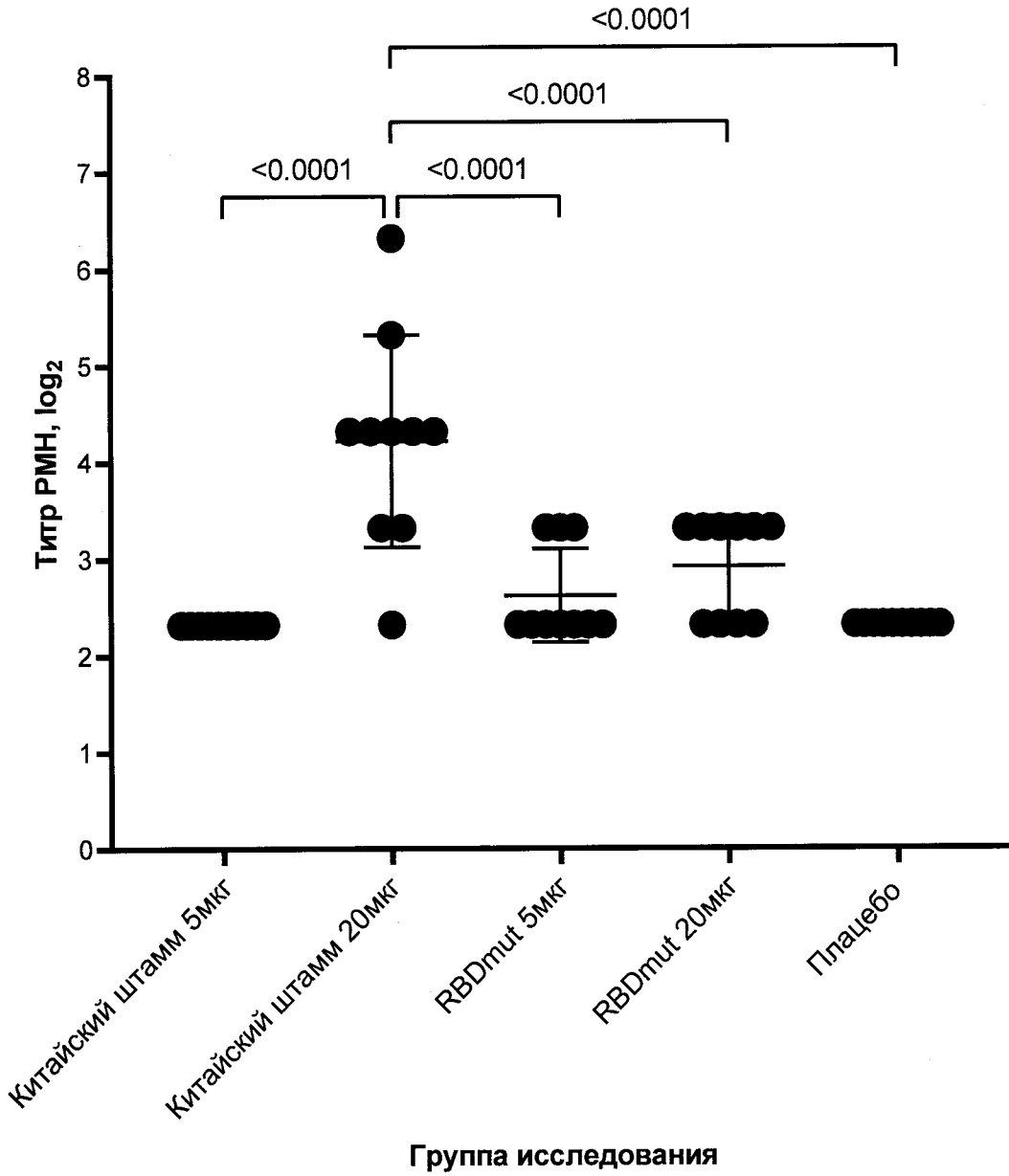
Фиг. 13



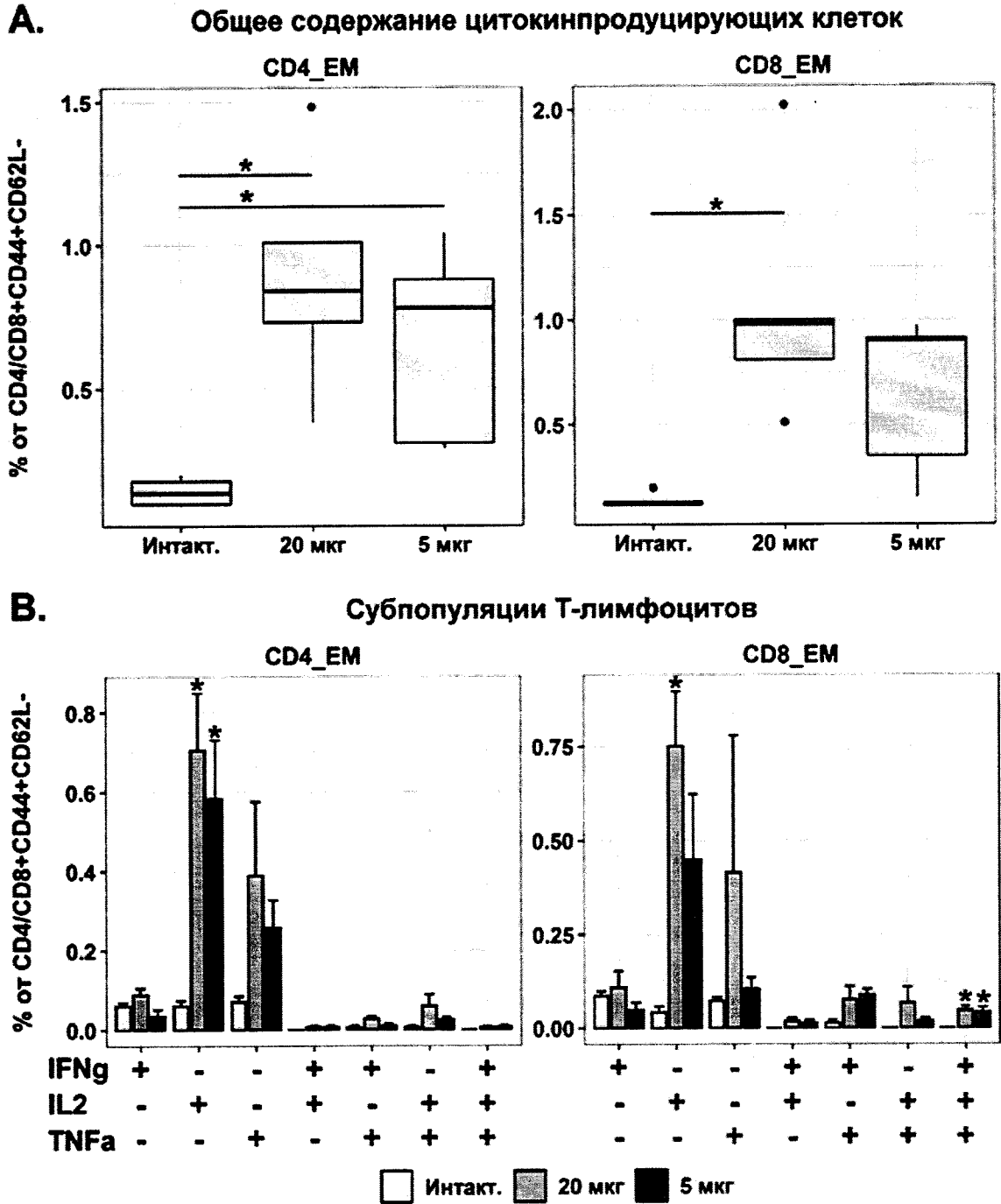
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2022/000408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see supplemental sheet) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, A61K, C12N, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PAJ, Espacent, USPTODB, RUPTO, EAPATIS, PatSearch		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZEZHONG LIU et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response, Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, volume 5, Article number: 282, abstract, p.2 left column	1-22
A	HAITAO LIU et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/CpG adjuvants, Vaccine, 26 November 2021, Volume 39, Issue 48, pages 7001-7011, abstract, drawing 1, p. 7002	1-22
A	RU 2749193 C1 (OOO BETUVAKS), 07.06.2021, abstract	1-22
A	RU 2723008 C9 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BIUDZHETNOE UCHREZHDENIE «NATSIONALNY ISSLEDOVATELSKY TSENTR EPIDEMIOLOGII I MIKROBIOLOGII IMENI POCHETNOGO AKADEMIKA N.F. GAMALEI» MINISTERSTVA ZDRAVOOKHRANENIIA ROSSIISKOI FEDERATSII), 08.09.2020, the claims	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 April 2023 (03.04.2023)		Date of mailing of the international search report 04 May 2023 (04.05.2023)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/000408

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter:1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000408

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (см. дополнительный лист)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																	
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>C07K, A61K, C12N, A61P</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p>PAJ, Espacent, USPTODB, RUPTO, EAPATIS, PatSearch</p>																	
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>ZEZHONG LIU et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response, Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, volume 5, Article number: 282, реферат, с.2 левая колонка</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>HAITAO LIU et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/CpG adjuvants, Vaccine, 26 November 2021, Volume 39, Issue 48, pages 7001-7011, реферат, рис.1, с. 7002</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RU 2749193 C1 (ООО БЕТУВАКС), 07.06.2021, реферат</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RU 2723008 C9 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ), 08.09.2020, формула</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	ZEZHONG LIU et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response, Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, volume 5, Article number: 282, реферат, с.2 левая колонка	1-22	A	HAITAO LIU et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/CpG adjuvants, Vaccine, 26 November 2021, Volume 39, Issue 48, pages 7001-7011, реферат, рис.1, с. 7002	1-22	A	RU 2749193 C1 (ООО БЕТУВАКС), 07.06.2021, реферат	1-22	A	RU 2723008 C9 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ), 08.09.2020, формула	1-22
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №															
A	ZEZHONG LIU et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response, Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, volume 5, Article number: 282, реферат, с.2 левая колонка	1-22															
A	HAITAO LIU et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/CpG adjuvants, Vaccine, 26 November 2021, Volume 39, Issue 48, pages 7001-7011, реферат, рис.1, с. 7002	1-22															
A	RU 2749193 C1 (ООО БЕТУВАКС), 07.06.2021, реферат	1-22															
A	RU 2723008 C9 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ), 08.09.2020, формула	1-22															
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																	
<table border="0"> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов:</td> <td>“I” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</td> <td>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>			* Особые категории ссылочных документов:	“I” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)		“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета		
* Особые категории ссылочных документов:	“I” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение																
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности																
“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста																
“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“&” документ, являющийся патентом-аналогом																
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)																	
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.																	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета																	
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>03 апреля 2023 (03.04.2023)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>04 мая 2023 (04.05.2023)</p>															
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18</p>		<p>Уполномоченное лицо: Терешкина Е.В. Телефон № (8-499) 240-25-91</p>															

Графа I Последовательность(и) нуклеотидов и/или аминокислот (Продолжение пункта 1.с первого листа)

1. Относительно любой последовательности нуклеотидов и/или аминокислот, раскрытой в международной заявке, международный поиск подготовлен на основе перечня последовательностей:
- a. в виде неотъемлемой части международной заявки в том виде, как она подана.
- b. представленного впоследствии после даты международной подачи для целей проведения международного поиска (Правило 13ter.1(a)),
- сопровождающийся заявлением о том, что перечень последовательностей не выходит за рамки первоначально поданной международной заявки.
2. Относительно любой нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности, раскрытой в международной заявке, этот отчет подготовлен в той степени, в которой полноценный поиск может быть осуществлен без перечня последовательностей в соответствии со Стандартом ВОИС ST.26.
3. Дополнительные комментарии:

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ
Классификация предмета изобретения

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000408

C07K 14/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)