



(51) МПК
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C07K 16/10 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/00 (2020.08); A61K 39/215 (2020.08); A61P 31/14 (2020.08); C07K 16/10 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020133915, 14.10.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 14.10.2020

Дата регистрации:
 07.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.10.2020

(45) Опубликовано: 07.12.2020 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово,
 ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора,
 зав. патентным отделом Мистюрину Ю.Н.

(72) Автор(ы):

Рыжиков Александр Борисович (RU),
 Рыжиков Евгений Александрович (RU),
 Богрянцева Марина Поликарповна (RU),
 Гаврилова Елена Васильевна (RU),
 Даниленко Елена Дмитриевна (RU),
 Иматдинов Ильназ Рамисович (RU),
 Максютлов Ринат Амирович (RU),
 Нечаева Елена Августовна (RU),
 Попова Анна Юрьевна (RU),
 Пьянков Олег Викторович (RU),
 Пьянкова Ольга Григорьевна (RU),
 Суслопаров Иван Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
 "Государственный научный центр
 вирусологии и биотехнологии "Вектор"
 Федеральной службы по надзору в сфере
 защиты прав потребителей и благополучия
 человека (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
 Роспотребнадзора) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2733834 C1, 07.10.2020. RU
 2733832 C1, 07.10.2020. RU 2733831 C1,
 07.10.2020. CN 111704614 A, 25.09.2020. WO
 2020191415 A1, 24.09.2020.

(54) Пептидные иммуногены и вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19 с использованием пептидных иммуногенов

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Представлены иммуногенные пептиды, используемые в качестве компонента вакцинной композиции против коронавирусной инфекции COVID-19, имеющие структуры, представленные на фиг.1. Описана вакцина против коронавирусной инфекции COVID-19, содержащая различные комбинации указанных пептидов: пептидные иммуногены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:

1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5; или пептидные иммуногены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; или пептидные иммуногены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; или пептидные иммуногены, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 7. Указанные пептидные иммуногены ковалентно связаны в виде конъюгатов с белком-носителем,

а смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя сорбирована на фармацевтически приемлемый адъювант. Техническим результатом изобретения является получение таких пептидных иммуногенов и вакцинных композиций, которые несут

минимально необходимые антигенные детерминанты для формирования специфического иммунного ответа у кроликов, хорьков и хомяков и индуцируют протективный иммунитет против Covid-19. 7 н. и 2 з.п.ф- лы, 5 ил., 4 табл., 7 пр.

R U 2 7 3 8 0 8 1 C 1

R U 2 7 3 8 0 8 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 14/00 (2020.08); A61K 39/215 (2020.08); A61P 31/14 (2020.08); C07K 16/10 (2020.08)(21)(22) Application: **2020133915, 14.10.2020**(24) Effective date for property rights:
14.10.2020Registration date:
07.12.2020

Priority:

(22) Date of filing: **14.10.2020**(45) Date of publication: **07.12.2020 Bull. № 34**

Mail address:

**630559, Novosibirskaya obl., r.p. Koltsovo, FBUN
GNTS VB "Vektor" Rospotrebnadzora, zav.
patentnym otdelom Mistyurinu YU.N.**

(72) Inventor(s):

**Ryzhikov Aleksandr Borisovich (RU),
Ryzhikov Evgenij Aleksandrovich (RU),
Bogryantseva Marina Polikarpovna (RU),
Gavrilova Elena Vasilevna (RU),
Danilenko Elena Dmitrievna (RU),
Imatdinov Ilnaz Ramisovich (RU),
Maksyutov Rinat Amirovich (RU),
Nechaeva Elena Avgustovna (RU),
Popova Anna Yurevna (RU),
Pyankov Oleg Viktorovich (RU),
Pyankova Olga Grigorevna (RU),
Susloparov Ivan Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
biotekhnologii "Vektor" Federalnoj sluzhby po
nadzoru v sfere zashity prav potrebitelej i
blagopoluchiya cheloveka (FBUN GNTS VB
"Vektor" Rospotrebnadzora) (RU)****(54) PEPTIDE IMMUNOGENS AND A VACCINE COMPOSITION AGAINST CORONAVIRUS INFECTION COVID-19 USING PEPTIDE IMMUNOGENS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: presented are immunogenic peptides used as a component of a vaccine composition against coronavirus infection COVID-19, having structures presented in Fig. 1. Described is a vaccine for coronavirus infection COVID-19, containing various combinations of said peptides: peptide immunogens having amino acid sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 5; or peptide immunogens having amino acid sequences SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 6; or peptide immunogens having amino acid sequences SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 6; or peptide immunogens having amino acid

sequences SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 7. Said peptide immunogens are covalently bound in the form of conjugates with a carrier protein, and the mixture of said conjugates of peptide immunogens and carrier protein is sorbed on a pharmaceutically acceptable adjuvant.

EFFECT: technical result of the invention is obtaining such peptide immunogens and vaccine compositions, which carry minimally required antigenic determinants to form a specific immune response in rabbits, ferrets and hamsters and induce the protective immunity against COVID-19.

9 cl, 5 dwg, 4 tbl, 7 ex

RU 2 738 081 C1

RU 2 738 081 C1

Изобретение относится к разработке профилактических противовирусных препаратов, а именно к получению вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19 и может быть использовано для профилактики этого заболевания.

Общая характеристика коронавирусной инфекции COVID-19

5 Коронавирус человека был впервые выделен D. Tyrrell и M. Bunue в 1965 г. от больного острым респираторным заболеванием (ОРВЗ), им удалось культивировать человеческий коронавирус на клетках трахеи [1]. Однако первое упоминание о коронавирусе, выделенном у цыплят больных бронхитом, относится к 1937 г.

10 Свое название коронавирусы получили в 1968 году благодаря сходству выростов (пепломеры) с corona spinatum - терновым венцом вокруг головы святого на средневековых религиозных картинах [2]. Поскольку многие коронавирусы плохо размножаются в культуре клеток, то долгое время молекулярно-биологические исследования их репликации отставали от аналогичных исследований других вирусов и в течение многих лет впервые обнаруживаемые вирусы относили к группе
15 коронавирусов только по их характерной морфологии [3]. Лишь в 1983 году были установлены характерные биохимические особенности, идентифицированы классы мРНК, их нуклеотидные последовательности, а также структурные белки [4, 5].

После открытия в 1965 году коронавирусы почти не привлекали внимание исследователей, поскольку выделенные штаммы 229Е и ОС43 вызывали относительно
20 легкие заболевания. Врачи лечили их как обычную простуду, пока в Китае в 2002-2003 годах не была зафиксирована вспышка атипичной пневмонии, или тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС, SARS). Заболевание зарегистрировано в 32 странах, наибольшее количество в Китае, Сингапуре, Канаде. Всего заболело 8273 человека, а 775 умерло (летальность 9,6%).

25 17 марта 2003 года ВОЗ была объявлена «глобальная тревога» в связи с распространением «атипичной пневмонии». Были привлечены 13 лабораторий из 9 стран для проведения объединенных исследований этого заболевания. В качестве приоритетных задач ставилось определение этиологического агента, и затем на основании этого - разработка диагностических тест систем. В результате тесного
30 сотрудничества ученых из лабораторий разных стран первая часть поставленной задачи была выполнена поразительно быстро. 16 апреля 2003 года ВОЗ было объявлено, что этиологическим агентом "атипичной пневмонии" является новый патоген, вирус SARS, относящийся к семейству коронавирусов, но не родственный ни одному из известных штаммов этого вируса [6]. С тех пор обнаружилось еще два коронавируса, которые
35 тоже вызывают простуду - NL63 и HKU1. В 2012 году - почти через 50 лет после его открытия - был окончательно секвенирован полный геном штамма 229Е.

В 2012 году были зарегистрированы первые случаи заболевания, вызванного коронавирусом. Заболевание в дальнейшем получило название ближневосточного респираторного синдрома (MERS), возбудителем которого являлся коронавирус MERS-
40 CoV [7]. В 2015 году в Южной Корее произошла вспышка ближневосточного респираторного синдрома, в ходе которой заболело 183 человека, умерло 33.

В декабре 2019 года несколько медицинских учреждений в китайском городе Ухань (провинция Хубэй) сообщили о пациентах с пневмонией [8]; клинические проявления напоминали симптомы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS),
45 заболевания, появившегося в 2002 году в соседнем районе - провинции Гуандун, вызванного коронавирусом SARS-CoV [9, 10]. 7 января 2020 г. был выделен новый штамм коронавируса, названный SARS-CoV-2, который вызывает коронавирусную болезнь 2019 года COVID-19. Полный геном SARS-CoV-2 уже достаточно изучен, его

первая широкая публикация китайскими органами здравоохранения была сделана вскоре после обнаружения вируса, что облегчило процесс диагностики и идентификации возбудителя инфекции.

SARS-CoV-2 - одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae, группе 2b бета-коронавирусов, который имеет по меньшей мере 70% сходство в генетической последовательности с SARS-CoV, его размер составляет около 100 нм [11].

Все известные коронавирусы (CoV) делятся на четыре рода, включая α -, β -, γ -, и δ -CoV. Представители первых двух родов способны инфицировать млекопитающих, тогда как γ - и δ -CoV инфицируют преимущественно птиц. Ранее было известно о шести коронавирусах, которые способны инфицировать человека. Это HCoV-229E и HCoV-NL63 (оба α -CoV), HCoV-NKU1 и HCoV-OC43 (оба β -CoV), - они вызывают легкие респираторные симптомы, сходные с простудой [12]. Два других β -коронавируса, SARS-CoV и MERS-CoV, приводят к тяжелым и потенциально смертельным инфекциям дыхательных путей человека [13-16]. Несмотря на тщательное изучение коронавирусов после вспышки ТОРС, пока не совсем ясно, почему три из них - SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 (источник пандемии COVID-19) - вызывают более тяжелые симптомы и приводят к более высокому уровню смертности, в то время как другие известные четыре коронавируса человека гораздо слабее.

Классификация инфекционного агента

В состав семейства Коронавирусы входят род Коронавирусы и род Торовирусы. Род Коронавирусы объединяет большие, оболочечные, позитивные одноцепочечные РНК-содержащие вирусы, которые вызывают широко распространенные заболевания человека и животных. Его представители могут быть выделены в три серологические подгруппы.

Серотипы и хозяева коронавирусов:

Антигенная группа	Вирус	Хозяин
1	Human coronavirus 229E (HCoV-229E) Porcine Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) Porcine respiratory coronavirus (PRCoV) Canine Coronavirus (CCoV) Feline enteric coronavirus (FECoV) Feline infectious peritonitis virus (FIPV) Rabbit coronavirus (RbCoV)	Человек Свиньи Свиньи Собаки Кошки Кошки Кролики
2	Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) Murine hepatitis virus (MHV) Sialodacryoadenitis virus (SDAV) Porcine hemagglutinating encephalomyelitis (HEV) Bovine coronavirus (BCoV) Turkey coronavirus (TCoV)	Человек Мыши Крысы Свиньи Крупный рогатый скот Индюки
3	Avian infectious bronchitis virus (IBV) Turkey coronavirus (TCoV)	Курицы Индюки

Как и другие респираторные вирусные инфекции, возбудитель COVID-19 в основном распространяется воздушно-капельным путем, через аэрозоли, а также через

загрязненные предметы и прямой контакт [12, 16].

Коронавирусы обладают широким тропизмом и могут поражать помимо дыхательных путей печень, почки, кишечник, нервную систему, сердце и глаза [13-15, 17, 18]. Типичная коронавирусная инфекция клинически проявляется гриппоподобным синдромом и/или кишечными расстройствами. При коронавирусной инфекции поражается альвеолярный эпителий. Коронавирусы, обладая способностью к индукции апоптоза, вызывают некроз пораженных тканей, а у пациентов после выздоровления остаются фиброзные рубцы в легких. Коронавирусы, индуцируя слияние клеток, оказывают сильное воздействие на проницаемость клеток, что приводит к нарушению водно-солевого баланса и транспорта белков. Вероятно, в этих условиях развиваются недостаточность сурфактанта (антиателектатический фактор), что приводит к коллапсу альвеол, и легочному дистресс-синдрому. Наиболее опасным свойством коронавирусов является их способность поражать макрофаги. Вероятнее всего, заболевание в особо тяжелой форме развивается на фоне блокирования основных звеньев иммунного ответа [16, 17, 19, 20].

Коронавирусы домашних и лабораторных животных вызывают инфекционный бронхит птиц, гепатит мышей, пневмонии у крыс, гастроэнтериты и энцефаломиелиты у свиней, часто заканчивающихся у животных смертельным исходом, что приводит к большим экономическим потерям [14].

Постановлением Главного санитарного врача РФ вирус SARS-CoV-2, как и некоторые другие представители этого семейства (вирусы SARS-CoV, MERS-CoV), отнесен ко II группе патогенности (патогенные биологические агенты, в отношении которых известны случаи летальных исходов заболевания и/или имеются сведения о высоком эпидемическом потенциале). SARS-CoV-2 включен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих [18, 21].

Случаи заболевания COVID-19 зарегистрированы в большинстве стран мира на всех континентах. 30 января ВОЗ признала вспышку нового коронавируса глобальной чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [12-14, 19, 20, 21]. 11 марта 2020 года Президент ВОЗ объявил COVID-19 глобальной пандемией, впервые назвав пандемией инфекционный процесс после пандемии гриппа H1N1 в 2009 году [12, 15, 19, 22].

Самый надежный способ остановить пандемию - массовая вакцинация. Разработка вакцины является критически важной задачей для системы здравоохранения. Именно поэтому работу по созданию вакцины для профилактики коронарусной инфекции (COVID-19) ведут более 80 компаний по всему миру. По данным ВОЗ на 9 сентября 2020 года на стадии доклинических исследований находились 145 вакцин, 12 из них разрабатывались с использованием пептидов в качестве действующего начала вакцины. Клинические исследования проводились для 35 вакцин, среди них только одна из них была разработана на пептидной платформе [23].

Известен изолированный полипептид вируса SARS и вакцина для профилактики тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) на его основе, содержащая инактивированный вирус SARS, убитый вирус SARS, ослабленный вирус SARS, препарат расщепленного вируса SARS или по крайней мере один очищенный антиген вируса SARS (заявка США №20060257852, МПК C07K 14/165, опубл. 16.11.2006 г.) [24].

Полипептид представляет собой полипептид Spike (S), полипептид Env (E), полипептид мембраны (M), полипептид гемагглютинин-эстеразы (HE), полипептид нуклеокапсида (N), полипептид ORF1a, полипептид ORF1ab, протеолитический фрагмент полипептида ORF1a или протеолитический фрагмент полипептида ORF1ab. Антиген представляет

собой очищенный инактивированный антиген вируса SARS в форме вирусоподобной частицы (VLP) и содержит адъювант в виде соли алюминия или MF59. Антигены выбраны из S, E, N и M. Инактивация антигена включает обработку вируса эффективным количеством одного или нескольких из следующих агентов, выбранных из группы, состоящей из детергентов, формальдегида, формалина, β -проприолактона и УФ-излучения.

Наиболее близким аналогом (прототипом) является вакцинная композиция для стимулирования иммунного ответа в отношении MERS-CoV (международная заявка № WO 2015042373, МПК А61К 39/215, опубл. 26.03.2015 г.). Вакцинная композиция содержит (i) эффективное количество наночастиц MERS-CoV, где наночастица содержит по меньшей мере один тример полипептида Spike, и (ii) адъювант на основе сапонины, где адъювант на основе сапонины состоит из Matrix M1. Наночастица содержит по меньшей мере от приблизительно пяти тримеров до приблизительно 30 тримеров полипептида Spike. Концентрация наночастицы составляет по меньшей мере от приблизительно 20 мкг/мл до приблизительно 60 мкг/мл. Авторами была показана иммуногенность вакцинных композиций на основе белка S и наличие вируснейтрализующих антител в сыворотках вакцинированных животных. Полноразмерный белок S представляет широкий набор высокоиммуногенных эпитопов, индуцирующий формирование широкого спектра антител.

Однако, в исследованиях выше указанных кандидатных вакцин против коронавирусов (SARS и MERS) был отмечен риск развития антителозависимого усиления (ADE) инфекции [26, 27].

Следовательно, разработка вакцины на основе синтетических пептидов, нацеленных на белок S SARS-CoV-2, может дать более безопасную и эффективную вакцину. Также для аналогов и прототипа не показана способность индуцировать иммунный ответ, способный оказывать защитное действия против нового вируса SARS-CoV-2.

Техническим результатом изобретения является получение таких пептидных иммуногенов и вакцинных композиций, которые несут минимально необходимые антигенные детерминанты для формирования специфического иммунного ответа у кроликов, хорьков и хомяков и индуцируют протективный иммунитет против Covid-19.

Указанный технический результат достигается тем, что получен первый пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцинной композиции против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **RGVYYPDKVFRSSVLHSTQD** (SEQ ID NO: 1), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен второй пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцинной композиции против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **CTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFK** (SEQ ID NO: 2), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен третий пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной

инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **RGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD** (SEQ ID NO: 3), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен четвертый пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **RLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGS** (SEQ ID NO: 4), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен пятый пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **DQLTPTWRVYSTGSNVQTR** (SEQ ID NO: 5), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен шестой пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **KNLNEIDLQELGKYEQYIK** (SEQ ID NO: 6), содержащей антигенные Т и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен седьмой пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью **KEIDRLNEVAKNLNEIDLQELGKYEQYIK** (SEQ ID NO: 7), содержащей участок белка S коронавируса SARS Cov-2, который обладает способностью индуцировать образование антител, обладающих антиген-специфической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

Указанный технический результат достигается тем, что получен химерный рекомбинантный белок MBP-6xHis-N_nCoV-2019, включающий N белок коронавируса SARS Cov-2, используемый в качестве белка-носителя в вакцинной композиции против коронавирусной инфекции COVID-19 и характеризующийся аминокислотной последовательностью:

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQ
 VAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRY
 5 NGKLIAYPIAVEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFN
 LQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGKYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIK
 NKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPT
 10 FKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLG
 AVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINA
 ASGRQTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNNLGIEGRGGSGHHHHHHS
 DNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASW
 15 FTALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRA TRRIRGGDGKMK
 DLSPRWYFYLGTPGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPA
 NNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRNSSRNSTPGSSRG
 20 TSPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAA
 EASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHW
 PQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVIL
 25 LNKHIDAYKTFPPTPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDD
 LSKQLQQSMSSADSTQA (SEQ ID NO: 8).

Указанный технический результат достигается также тем, что получена вакцинная композиция №1 против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующаяся тем, что содержит пептидные иммуногены по п.п. 1, 3 и 5, имеющие аминокислотные
 30 последовательности (SEQ ID NO: 1), (SEQ ID NO: 3) и (SEQ ID NO: 5) соответственно и ковалентно связанные в виде конъюгатов с белком-носителем, причем смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя сорбирована на фармацевтически приемлемый адъювант.

Указанный технический результат достигается также тем, что получена вакцинная композиция №2 против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующаяся тем, что содержит пептидные иммуногены по п.п. 2, 4 и 6, имеющие аминокислотные
 35 последовательности (SEQ ID NO: 2), (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 6) соответственно и ковалентно связанные в виде конъюгатов с белком-носителем, причем смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя сорбирована
 40 на фармацевтически приемлемый адъювант.

Указанный технический результат достигается также тем, что получена вакцинная композиция №3 против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующаяся тем, что содержит пептидные иммуногены по п.п. 4 и 6, имеющие аминокислотные
 45 последовательности (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 6) соответственно и ковалентно связанные в виде конъюгатов с белком-носителем, причем смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя сорбирована на фармацевтически приемлемый адъювант.

Указанный технический результат достигается также тем, что получена вакцинная

композиция №4 против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующаяся тем, что содержит пептидные иммуногены по п.п. 4 и 7, имеющие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 7) соответственно и ковалентно связанные в виде конъюгатов с белком-носителем, причем смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя сорбирована на фармацевтически приемлемый адъювант.

Конъюгаты пептидных иммуногенов с белком-носителем взяты в равных соотношениях между собой и белком-носителем. В качестве белка-носителя вакцинальная композиция содержит химерный рекомбинантный белок-носитель по п. 8, характеризующийся аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 8). В качестве адъюванта вакцинальная композиция содержит гидроокись алюминия в количестве 0,2-2,0 мг/мл.

Изобретение поясняется следующими графическими материалами. На фиг. 1 представлены аминокислотные последовательности семи пептидных иммуногенов. На фиг. 2 приведена аминокислотная последовательность химерного белка «MBP-6xHis-N_nCoV-2019». На фиг. 3 представлена нуклеотидная последовательность гена химерного белка «MBP-6xHis-N_nCoV-2019». На фиг. 4 изображена генетическая и физическая карта рекомбинантной плазмидной ДНК «pMBP-6xHis-N_nCoV-2019». На фиг. 5 представлена электрофореграмма рестрикционного анализа рекомбинантной плазмидной ДНК «pMBP-6xHis-N_nCoV-2019» в 1.5% агарозном геле.

Пример 1. Получение и структура пептидных иммуногенов.

При разработке вакцины, используя литературные данные о Т- и В-клеточных эпитопах белка S нового коронавируса SARS Cov-2, были спроектированы структуры 7 пептидов - аналогов иммуногенных Т и В-клеточных эпитопов белка S нового коронавируса SARS Cov-2, которые затем были синтезированы (фиг. 1). Последовательность этих синтетических пептидов, моделирующих функционально значимые участки белка S нового коронавируса SARS Cov-2, были спроектированы таким образом, чтобы исключить присутствие элементов, ответственных за развитие иммунопатологического состояния, но сохранить способность индуцировать образование защитных антител и обеспечить защиту организма от развития COVID-19. Синтетические пептиды имеют размер от 20 до 31 аминокислотных остатков и аналогичны Т и В-клеточным эпитопам белка S нового коронавируса SARS Cov-2.

Синтез спроектированных аминокислотных последовательностей проводится с использованием стандартного оборудования и методик твердофазного пептидного синтеза и может быть проведен с использованием любых других методик синтеза аминокислотных последовательностей, например, таких как жидкофазный пептидный синтез, синтез с использованием генетически модифицированных микроорганизмов (технологии получения рекомбинантных белков), фрагментирование нативного белка с последующим выделением соответствующих фрагментов.

Ниже приведены структуры синтезированных пептидов.

Первый пептид (п. 1): **RGVYYPDKVFRSSVLHSTQD** (0034-0053), (SEQ ID NO: 1);

Второй пептид (п. 2): **CTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFK** (0166-0187), (SEQ ID NO: 2);

Третий пептид (п. 3): **RGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD** (0403-0428), (SEQ ID NO: 3);

Четвертый пептид (п. 4): **RLFRKSNLKPFERDISTEIQAGS** (0454-0477), (SEQ ID NO: 4);

Пятый пептид (п. 5): **DQLTPTWRVYSTGSNVFQTR** (0626-0644), (SEQ ID NO: 5);

Шестой пептид (п. 6): **KNLNE⁵SLIDLQELGKYEQYIK** (1189-1209), (SEQ ID NO: 6);

Седьмой пептид (п. 7): **KEIDRLNEVAKNLNE⁵SLIDLQELGKYEQYIK** (1179-1209), (SEQ ID NO: 7).

Пример 2. Получение химерного рекомбинантного белка-носителя.

Белок-носитель является продуктом экспрессии гена химерного белка «MBP-6xHis-
10 N_nCoV-2019» в прокариотической системе. Акцепторный плазмидный вектор рMBP-6xHis получен путем направленного клонирования в вектор рT7 фрагмента гена MBP E.coli, амплифицированного из генома E.coli с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Клонирование проведено по сайтам узнавания
15 эндонуклеаз рестрикции NdeI-VamHI, где за счет обратного праймера в открытую рамку считывания MBP добавлена нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотный линкер, сайт протеолитического расщепления фактора Ха и 6xHis-метка, необходимая для проведения металл-хелатной аффинной хроматографии. Вектор рT7 получен посредством направленного клонирования химически синтезированного
20 фрагмента ДНК, кодирующего ген LacI, необходимого для контроля экспрессии за счет включения лактозного оператора LacO в транскрипционную кассету целевого гена, гена гор необходимого для контроля копийности плазмидной ДНК в бактериальной клетке, а также структурных элементов, обеспечивающих экспрессию
целевого гена: модифицированного промотора бактериофага T7 PT7/O (T. Giordano et al., 1989 г.), сайт связывания рибосом гена 10 бактериофага T7 (Olins and Rangwala, 1989
25 г.) и терминатора транскрипции ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7. Плазмидный вектор кодирует ген устойчивости к β-лактамам (β-лактамаза), а также ориджин репликации бактериофага F1.

Экспрессирующий вектор рMBP-6xHis-N_nCoV-2019 получен посредством направленного клонирования ампликона гена N_nCoV-2019 по сайтам узнавания
30 эндонуклеаз рестрикции VamHI и SalI. Открытая рамка считывания гена химерного белка «MBP-6xHis-N_nCoV-2019» представлена лидирующей последовательностью мальтоза-связывающего белка MBP E.coli, аминокислотного линкера, сайта протеолитического расщепления фактора Ха, 6xHis-метки для проведения металл-хелатной аффинной хроматографии, и последовательностью гена N коронавируса
35 SARS-CoV-2 (nCoV-2019). Нуклеотидная последовательность гена химерного белка «MBP-6xHis-N_nCoV-2019» представлена на фиг. 3, а на фиг. 2 - аминокислотная последовательность химерного белка «MBP-6xHis-N_nCoV-2019». Нуклеотидная вставка в вектор рMBP-6xHis осуществлена таким образом, что ген «MBP-6xHis-N_nCoV-2019» находится под контролем модифицированного промотора бактериофага T7 PT7/O,
40 старт-кодон (ATG) расположен на оптимальном расстоянии от сайта связывания рибосом гена 10 бактериофага T7. Дополнительный лактозный оператор (LacO) позволяет контролировать уровень экспрессии целевого гена при коэкспрессии LacI. Для идентификации клонируемой последовательности используется метод определения первичной последовательности ДНК на автоматическом секвенаторе. Клонлируемый
45 фрагмент ДНК фланкирован сайтами рестрикции - VamHI-SalI. Клонлируемый фрагмент ДНК содержит открытую рамку считывания гена N коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019). Положение клонируемого гена внутри кассеты, а также положение регуляторных элементов отображено на фиг. 4 - физической и генетической карте рекомбинантной

плазмидной ДНК «pMBP-6xHis-N_nCoV-2019». Способ введения конструкции в прокариотической системе - трансформация клеток *Escherichia coli* плазмидой.

Селективный маркер - ген устойчивости к β -лактамам (β-лактамаза).

Основные генетические элементы, содержащиеся в структуре плазмидной ДНК:

5 PT7/O promoter - модифицированный промотор бактериофага T7 PT7/O (21-64 п.н.)

Lac operator - лактозный оператор (40-64 п.н.)

RBS [bacteriophage T7 gene 10] - сайта связывания рибосом гена 10 бактериофага T7 (79-101 п.н.)

MBP - мальтоза-связывающий белок MBP *E.coli* (109-1209 п.н.)

10 Factor Xa site - сайт протеолитического расщепления фактора Xa (1258-1269 п.н.)

6xHis - 6-гистидиновая аффинная метка (1282-1299 п.н.)

N - последовательность гена N коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019) (1309-2562 п.н.)

15 T7 terminator - терминатор транскрипции ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7 (2653-2700 п.н.)

Ori - ориджин репликации pBR322/pUC (4355-4943 п.н.)

AmpR- ген β-лактамазы (устойчивость к ампициллину) (3324-4184 п.н.)

LacI - ген репрессора LacI (6376-7455 п.н.)

20 Карта (электрофореграмма) рестриционного анализа рекомбинантной плазмидной ДНК «pMBP-6xHis-N_nCoV-2019» в 1.5% агарозном геле с использованием эндонуклеаз рестрикции XbaI, BglII, XhoI, HindIII, NcoI, AvaII представлена на фиг. 5.

Фрагменты ДНК, полученные после гидролиза рекомбинантной плазмиды «pMBP-6xHis-N_nCoV-2019» эндонуклеазами рестрикции XbaI, BglII, XhoI, HindIII, NcoI, AvaII (1-6 трек, соответственно).

25 Ниже представлены расчетные длины фрагментов ДНК, образующихся после гидролиза соответствующими эндонуклеазами рестрикции:

1: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

XbaI 1.7825 bp

2: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

30 BglII

1. 6685 bp

2. 1140 bp

3: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

XhoI

35 1. 7825 bp

4: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

HindIII

1. 7825 bp

5: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

40 NcoI

1. 7825 bp

6: pMBP-6xHis-N_nCoV-2019

AvaII

1. 2082 bp

45 2. 1746 bp

3. 1584 bp

4. 777 bp

5. 509 bp

- 6. 376 bp
- 7. 279 bp
- 8. 222 bp
- 9. 91 bp
- 10. 88 bp
- 11. 42 bp
- 12. 29 bp

Далее рекомбинантный химерный белок-носитель МВР-6xHis-N_nCoV-2019, нарабатывают в прокариотической системе, биомассу осаждают центрифугированием, ресуспендируют в буфере 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 0.5 мг/мл лизоцим, рН 8.0 и охлаждают до 2-5°C. Биомассу, полученную с 10 литров питательной среды ресуспендируют в 300 мл буфера. Затем клетки разрушают в ультразвуковом дезинтеграторе до полного осветления суспензии при температуре не выше 40°C. Полученный лизат охлаждают до 2-5°C, центрифугируют при 12000 об/мин в течение 20 минут. К супернатанту добавляют насыщенный раствор сульфата аммония в соотношении 1:1 по объему и перемешивают взбалтыванием, после чего охлаждают при 4-8°C в течении 5-6 часов. Осадок отделяют центрифугированием при 12000 об/мин в течении 20 минут (температура 10°C), который затем растворяют в буфере: 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, рН 8.0 и охлаждают при 4-8°C в течение 1 часа. Объем буфера рассчитывается как половина объема лизата. Полученный раствор центрифугируют при 12000 об/мин в течение 20 минут при температуре 10°C. Супернатант хранят при температуре 4-8°C в течение 5 дней и используют для аффинной хроматографии.

Для аффинной хроматографии используют сорбент Ni-NTA-Superflow (QIAGEN) или его аналоги. Количество сорбента берется из расчета 100 мл на 1 грамм ожидаемого количества целевого белка. Используется колонка среднего давления с высотой столба не выше 30 см. Сорбент дегазируется, наносится в колонку и уравнивается буфером: 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, рН 8.0. Осветленный центрифугированием супернатант лизата клеток пропускают через колонку со скоростью 2,5-4 мл/мин. Колонку промывают 5-кратным объемом буфера: 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, рН 8.0, затем 40-кратным объемом буфера: 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, рН 8.0. Элюцию целевого белка проводят буфером: 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, рН 8.0. Элюцию контролируют по оптической плотности на длине волны 280 нм. Собирают одну фракцию первого пика, которую можно хранить до 5 дней при температуре 4-8°C. Полученная фракция содержит целевой продукт - химерный рекомбинантный белок-носитель МВР-6xHis-N_nCoV-2019. Расчетная молекулярная масса химерного рекомбинантного белка-носителя МВР-6xHis-N_nCoV-2019 составляет 89,2 кДа.

Поскольку химерный белок-носитель содержит Т-клеточные эпитопы SARS-CoV-2, то он не только повышает стабильность пептидных иммуногенов и участвует в формировании выраженного иммунного ответа, но и стимулирует специфический клеточный иммунный ответ.

Пример 3. Получение конъюгатов пептидных иммуногенов и белка-носителя, а также вакцинных композиций.

После синтеза пептидных иммуногенов осуществляют их конъюгирование с белком-носителем для повышения стабильности и формирования выраженного иммунного ответа.

В качестве белка-носителя в вариантах вакцины был использован рекомбинантный химерный белок, содержащий аминокислотную последовательность нуклеопротеина N нового коронавируса SARS-CoV-2, полученный по примеру 2. Кроме того, в качестве белков-носителей могут быть использованы такие белки как БСА (бычий сывороточный альбумин), KLH (keyhole limpet hemocyanin) - гемоцианин, овальбумин (альбумин яичного белка) или другие рекомбинантные белки.

Ковалентная связь между белком-носителем и пептидным иммуногеном может быть создана с использованием различных конъюгирующих агентов, например, таких как ГА (глутаровый альдегид), SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), и многие другие.

Конъюгирование пептида с белком-носителем с помощью конъюгирующего агента Sulfo-SMCC проводят следующим образом: 20 мг белка-носителя растворяют в 2 мл дистиллированной воды. Непосредственно перед использованием готовят раствор Sulfo-SMCC с концентрацией 5 мг/мл. Добавляют 2 мл раствора Sulfo-SMCC.

Инкубируют при комнатной температуре в течение 60 минут, или при температуре 37°C в течение 30 минут, периодически осторожно перемешивают. Для удаления избытка Sulfo-SMCC колонку 50 мл со смолой Sepharose CL4B уравнивают 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором. Наносят на колонку активированный белок-носитель и собирают первый пик, при этом используют для детекции длину волны 280 нм.

Далее 20 мг пептида растворяют в 5 мл 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором. Немедленно смешивают пептид и активированный белок-носитель и инкубируют 2 часа при комнатной температуре. Для удаления избытка пептида колонку 50 мл с сорбентом Sepharose CL4B уравнивают 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором. Наносят на колонку конъюгат пептида с белком-носителем и собирают первый пик, при этом используют для детекции длину волны 280 нм.

Для увеличения иммунного ответа используют адъювант. Существует множество известных адъювантов, включая адъювант Фрейнда (CFA or FCA), суспензии гидроксида алюминия, адъювант MF59 и др.

Полученные конъюгаты пептида и белка-носителя сорбируют на гидроксиде алюминия для получения готовой лекарственной формы в конечной концентрации (100-1000) мкг пептида в 1,0 мл препарата.

В качестве примеров приведены следующие составы вакцинных композиций.

Вакцинная композиция №1: смесь пептидных иммуногенов, имеющих аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 1), (SEQ ID NO: 3) и (SEQ ID NO: 5) соответственно и ковалентно связанных в виде конъюгатов с химерным рекомбинантным белком-носителем MBP-6xHis-N_nCoV-2019, взятых в равных соотношениях и сорбированных на фармацевтически приемлемый адъювант гидроокись алюминия в количестве 1,0 мг/мл.

Вакцинная композиция №2: смесь пептидных иммуногенов, имеющих аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 2), (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 6) соответственно и ковалентно связанных в виде конъюгатов с химерным рекомбинантным белком-носителем MBP-6xHis-N_nCoV-2019, взятых в равных соотношениях и сорбированных на фармацевтически приемлемый адъювант гидроокись алюминия в количестве 2,0 мг/мл.

Вакцинная композиция №3: смесь пептидных иммуногенов, имеющих аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 6) соответственно и ковалентно связанных в виде конъюгатов с химерным рекомбинантным белком-носителем MBP-

6xHis-N_nCoV-2019, взятых в равных соотношениях и сорбированных на фармацевтически приемлемый адъювант гидроокись алюминия в количестве 1,5 мг/мл.

Вакцинная композиция №4: смесь пептидных иммуногенов, имеющих аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 4) и (SEQ ID NO: 7) соответственно и ковалентно связанных в виде конъюгатов с химерным рекомбинантным белком-носителем МВР-6xHis-N_nCoV-2019, взятых в равных соотношениях и сорбированных на фармацевтически приемлемый адъювант гидроокись алюминия в количестве 0,2 мг/мл.

Пример 4. Исследование иммуногенности пептидных иммуногенов на кроликах.

Для получения иммунных сывороток используют лабораторных животных - кроликов породы Шиншилла с массой тела 2000-3000 г. Предварительно перед иммунизацией у кроликов берут пробу крови в объеме 1,0 мл из краевой вены уха и выделяют сыворотку для дальнейшего иммуноферментного анализа. Температура хранения сыворотки от минус 15°C до минус 25°C.

Каждый из 7 пептидов конъюгируют с белком-носителем гемоцианином и в смеси с неполным адъювантом Фрейнда двукратно с интервалом 7 дней подкожно вводят кроликам. Через 7 суток после второй иммунизации у кроликов берут пробу крови в объеме 1,0 мл из краевой вены уха. Из крови выделяют сыворотку для проведения иммуноферментного анализа. Сыворотки крови кроликов хранят при температуре от минус 15°C до минус 25°C.

Результаты определения титров специфических антител в сыворотках иммунных кроликов к соответствующим пептидам и к рекомбинантному белку S представлены в Таблице 1.

25

30

35

40

45

Таблица 1

Обратные титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных пептидными иммуногенами, к соответствующим пептидным иммуногенам и рекомбинантному белку S коронавируса nCoV-2019.

Номер группы	Номер животного	Обратный титр к соответствующему пептидному иммуногену до иммунизации	Обратный титр к соответствующему пептидному иммуногену на 7 день после 2-ой иммунизации	Обратный титр к рекомбинантному белку S nCoV-2019 на 7 день после 2-ой иммунизации
Гр.1 пептидный иммуноген (п.1)	1	<100	12800	3200
	2	<100	25600	6400
	3	<100	6400	3200
СГТ			12800	4032
Гр.2 пептидный иммуноген (п.2)	4	<100	6400	400
	5	<100	12800	800
	6	<100	12800	1600
СГТ			10159	800
Гр.3 пептидный иммуноген (п.3)	7	<100	25600	3200
	8	<100	12800	1600
	9	<100	3200	1600
СГТ			10159	2016
Гр.4 пептидный иммуноген (п.4)	10	<100	25600	12800
	11	<100	51200	51200
	12	<100	51200	12800
СГТ			40637	20319
Гр.5 пептидный иммуноген (п.5)	13	<100	102400	51200
	14	<100	204800	51200
	15	<100	25600	25600
СГТ			81275	40637
Гр.6 пептидный иммуноген (п.6)	16	<100	204800	51200
	17	<100	102400	25600
	18	<100	102400	51200
СГТ			129016	40637
Гр.7 пептидный иммуноген (п.7)	19	<100	102400	25600
	20	<100	204800	25600
	21	<100	204800	51200
СГТ			162550	32254

Примечание. СГТ – среднегеометрический титр по группе животных.

Иммуноферментный анализ для определения титра антител к соответствующим антигенам проводят следующим образом:

В 96-ти луночный планшет вносят сорбционный буфер по 150 мкл в лунку. В качестве сорбционного буфера использовать 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер (рН 9,5-9,7) с добавлением соответствующего антигена с концентрацией 1 мкг/мл. Инкубируют 16 часов при комнатной температуре.

Перед нанесением испытуемых образцов сыворотки промывают иммуносорбент 0,01 М ФСБ-Т (рН 7,3-7,5). Вносят в планшет по 100 мкл разводящего буферного раствора для образца и в ряд «А» вносят образцы сывороток по 100 мкл и титруют с шагом 2. Инкубируют в термошейкере при температуре (37±2)°С, 700 об/мин в течение 45 минут.

По окончании инкубации содержимое лунок удаляют с помощью вошера и промывают 0,01 М ФСБ-Т. Вносят во все лунки по 100 мкл антивидового конъюгата и инкубируют в термошейкере при температуре $(37\pm 2)^\circ\text{C}$, 700 об/мин в течение 30 минут. По окончании инкубации содержимое лунок удаляют с помощью вошера и промывают
5 0,01 М ФСБ-Т. Вносят во все лунки по 100 мкл хромогенного субстрата (ТМБ) для окрашивания образовавшихся специфических АГ-АТ комплексов.

Инкубируют в темноте при комнатной температуре $(24\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 20 минут. Вносят во все лунки по 50 мкл СТОП-реагента для прекращения реакции. Результаты ИФА регистрируют с помощью микропланшетного ридера, измеряя оптическую
10 плотность (ОП) на длине волны 450 нм.

Титром антител считается максимальное разведение исследуемой сыворотки, при котором оптическая плотность раствора превышает $\text{ОП}_{\text{крит}}$.

Таким образом, двукратная иммунизация кроликов пептидными иммуногенами индуцирует у кроликов выработку антител к пептидным иммуногенам в диапазоне
15 СГТ от 1:10159 до 1:162550 и к рекомбинантному белку S коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019) в диапазоне СГТ от 1:800 до 1:40637.

Пример 5. Исследование иммуногенности пептидных иммуногенов и вакцинных композиций на мышах.

Для получения иммунных сывороток используют лабораторных животных - мышей
20 ICR с массой тела 14-16 г. Предварительно перед иммунизацией у мышей берут пробу крови в объеме 100 мкл из ретроорбитального синуса и выделяют сыворотку для дальнейшего иммуноферментного анализа. Температура хранения сыворотки от минус 15°C до минус 25°C .

Каждый из 7 пептидов, конъюгируют с химерным рекомбинантным белком-носителем
25 MBR-6xHis-N_nCoV-2019 по п. 8. Готовят вакцинные композиции, смешивая пептидные иммуногены в равных количествах в соответствии с п. 9, п. 10, п. 11, п. 12. формулы изобретения. Пептидные иммуногены и вакцинные композиции сорбируют на адьювант гидроокись алюминия. Вакцинируют мышей подкожно двукратно с интервалом 14
30 дней. Через 14 дней после второй вакцинации из ретроорбитального синуса отбирают кровь в объеме 100 мкл. Из крови выделяют сыворотку для проведения иммуноферментного анализа. Сыворотки крови мышей хранят при температуре от минус 15°C до минус 25°C .

Результаты определения титров специфических антител в сыворотках иммунных мышей к соответствующим пептидным иммуногенам, вакцинным композициям и к
35 рекомбинантному белку S коронавируса представлены в Таблице 2.

Имуноферментный анализ для определения титра к соответствующим антигенам проводят аналогично тому, как описано в примере 4.

Таким образом, двукратная иммунизация мышей пептидными иммуногенами и их вакцинными композициями индуцировало у мышей выработку антител к пептидным
40 иммуногенам в диапазоне СГТ от 1:1838 до 1:11143 и к рекомбинантному белку S коронавируса SARS-CoV-2 (nCoV-2019) в диапазоне СГТ от 1:459 до 1:3676.

Таблица 2

Обратные титры антител в сыворотках мышей, иммунизированных пептидными иммуногенами и вакцинными композициями, к соответствующим антигенам и рекомбинантному белку S коронавируса nCoV-2019

Номер группы	Номер животного	Обратный титр к соответствующему иммуногену до иммунизации	Обратный титр к соответствующему иммуногену на 14 день после 2-ой иммунизации	Обратные титры к рекомбинантному белку S nCoV-2019 на 14 день после 2-ой иммунизации
Гр.1 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.1)	1	<100	6400	3200
	2	<100	3200	800
	3	<100	6400	1600
	4	<100	12800	6400
	5	<100	6400	3200
СГТ			6400	2425
Гр.2 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.2)	6	<100	6400	1600
	7	<100	3200	800
	8	<100	6400	1600
	9	<100	3200	800
	10	<100	3200	1600
СГТ			4222	1213
Гр.3 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.3)	11	<100	3200	800
	12	<100	1600	400
	13	<100	800	100
	14	<100	3200	1600
	15	<100	1600	400
СГТ			1838	459
Гр.4 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.4)	16	<100	6400	1600
	17	<100	12800	6400
	18	<100	3200	800
	19	<100	12800	3200
	20	<100	25600	6400
СГТ			9701	2786
Гр.5 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.5)	21	<100	6400	1600
	22	<100	12800	6400
	23	<100	3200	400
	24	<100	12800	3200
	25	<100	3200	800
СГТ			6400	1600
Гр.6 пептидный иммуноген содержащий пептид (п.6)	26	<100	12800	3200
	27	<100	12800	6400
	28	<100	25600	6400
	29	<100	6400	1600
	30	<100	6400	1600
СГТ			11143	3200
Гр.7	31	<100	3200	800
	32	<100	6400	1600

	пептидный иммуноген содержащий пептид (п.7)	33	<100	6400	3200
		34	<100	12800	6400
		35	<100	12800	3200
5	СГТ			7352	2425
	Гр.8	36	<100	6400	800
	Вакцинная композиция №1	37	<100	12800	3200
		38	<100	3200	800
		39	<100	6400	1600
10		40	<100	12800	3200
	СГТ			7352	1600
	Гр.9	41	<100	6400	1600
	Вакцинная композиция №2	42	<100	12800	1600
		43	<100	3200	800
		44	<100	12800	3200
15		45	<100	25600	6400
	СГТ			9701	2111
	Гр.10	46	<100	1600	1600
	Вакцинная композиция №3	47	<100	12800	3200
		47	<100	3200	1600
20		49	<100	6400	3200
		50	<100	1600	800
	СГТ			3676	1838
	Гр.11	51	<100	6400	3200
	Вакцинная композиция №4	52	<100	12800	6400
		53	<100	6400	6400
25		54	<100	6400	3200
		55	<100	6400	1600
	СГТ			7352	3676

Примечание. СГТ – среднегеометрический титр по группе животных

Пример 6. Протективность вакцинных композиций на основе пептидных иммуногенов на хомяках.

Исследования протективности вакцинных композиций пептидных иммуногенов проводили после 2-кратной внутримышечной иммунизации хомяков с интервалом 14 суток дозой 200,0 мкг. На 28-е сутки после первой вакцинации хомяки были интраназально заражены новым коронавирусом SARS-CoV-2 штамм nCov/Victoria/1/2020 в дозе 10^2 ФОБ. На 2-е, 4-е, 6-е и 8-е сутки после заражения у животных брались носовые смывы, в ОТ-ПЦР определялась вирусная нагрузка. На 8-е сутки животных подвергали эвтаназии, извлекали легкие и вычисляли отношение (индекс) массы легких и массы тела. В таблице 3 приведены результаты измерения.

При гистологическом исследовании легких хомяков на 8-е сутки после заражения тяжелые патологические изменения наблюдались в плацебо группе животных, где обнаруживалась полная потеря эпителиальной выстилки мелких бронхов и бронхиол, очаги некротизации, плазматическое пропитывание стенок сосудов, значительные по площади зоны ателектаза. Гораздо меньшая степень проявления инфекции наблюдалась у вакцинированных животных, где явления отека и воспалительно-клеточной инфильтрации были локальными, дистрофические изменения эпителия мелких бронхов и кровеносных сосудов микроциркуляторного русла отмечались на относительно

небольших участках легочной паренхимы

Таким образом, двукратное с интервалом 14 суток введение вакцинных композиций пептидных иммуногенов индуцировало у хомяков выработку антител к антигенам вакцины и цельновирионному антигену коронавируса, статистически значимо снижает индекс массы легкие/тело и обеспечивает защиту животных от развития пневмонии после интраназального заражения коронавирусом SARS-CoV-2.

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 3

Протективность вакцинных композиций пептидных иммуногенов против
коронавируса SARS-CoV-2 штамм nCov/Victoria/1/2020. Доза заражения 10^2

ФОЕ интраназально. Хомяки

Номер группы	Номер животного	Вирусная нагрузка в носовом смыве, Сг				Индекс массы легкие/тело
		2 сут п.з.	4 сут п.з.	6 сут п.з.	8.сут п.з.	
Гр.1 Композиция пептидных иммуногенов №1 по п.9	1	10,77	17,91	19,08	19,43	0,0082
	2	9,91	18,17	18,86	18,35	0,0073
	3	8,37	16,92	16,75	23,51	0,0059
	4	9,92	15,34	19,1	18,84	0,0065
	5	8,88	17,27	16,56	18,43	0,0089
	СЗ	9,6	17,1	18,1	19,7	0,0074
	ДИ95	0,74	0,87	1,02	1,70	0,0010
Гр.2 Композиция пептидных иммуногенов №2 по п.10	6	11,48	13,04	20,88	22,14	0,0088
	7	10,11	12,76	18,74	21,3	0,0081
	8	10,36	13,46	16,38	20,47	0,0079
	9	7,15	18,77	17,71	20,87	0,0070
	10	19,51	15,41	16,87	22,14	0,0086
	СЗ	11,7	14,7	18,1	21,4	0,0081
	ДИ95	3,64	1,96	1,40	0,59	0,0006
Гр.3 Композиция пептидных иммуногенов №3 по п.11	11	12,1	14,99	17,96	23,76	0,0072
	12	11,23	13,09	16,23	25,55	0,0083
	13	13,59	13,54	15,92	23,27	0,0069
	14	12,57	13,53	17,76	24,16	0,0075
	15	11,73	12,48	18,97	26,76	0,0079
	СЗ	12,2	13,5	17,4	24,7	0,0076
	ДИ95	0,70	0,73	1,00	1,12	0,0004
Гр.4 Композиция пептидных иммуногенов №4 по п.12	16	8,26	12,01	12,84	22,74	0,0058
	17	11,44	12,02	12,02	19,12	0,0089
	18	9,08	13,16	19,18	25,01	0,0061
	19	8,47	11,36	15,04	16,43	0,0109
	20	10,94	10,22	18,80	20,92	0,0081
	СЗ	9,6	11,8	15,6	20,8	0,0080
	ДИ95	1,14	0,84	2,59	2,58	0,0016
Гр.5 Плацебо	21	8,91	17,17	16,86	18,43	0,0095
	22	8,57	16,62	16,35	17,35	0,0105
	23	9,52	15,72	19,8	24,51	0,0103
	24	8,18	21,34	16,51	16,74	0,0112
	25	7,16	18,17	18,21	20,78	0,0114
	СЗ	8,5	17,8	17,5	19,6	0,0106
	ДИ95	0,69	1,70	1,14	2,48	0,0006

Примечания. СЗ - Среднее значение по группе; ДИ95 - 95%-ный доверительный интервал; Плацебо – физиологический раствор 0,9% хлорида натрия

Пример 7. Протективность вакцинных композиций на основе пептидных иммуногенов на хорьках.

Исследования протективности комбинаций пептидных иммуногенов проводили

после 2-кратной внутримышечной иммунизации хорьков с интервалом 14 суток дозой 200,0 мкг. На 28-е сутки после первой вакцинации хорьки были интраназально заражены новым коронавирусом SARS-CoV-2 штамм nCov/Victoria/1/2020 в дозе 10^3 ФОБ. На 2-е, 4-е, 6-е и 8-е сутки после заражения у животных брались носовые смывы, в ОТ-ПЦР определялась вирусная нагрузка. На 8-е сутки животных подвергали эвтаназии, извлекали легкие и вычисляли отношение (индекс) массы легких и массы тела. В таблице 4 приведены результаты измерения

Таким образом, при изучении протективных свойств вакцинных композиций на основе пептидных иммуногенов на хорьках было установлено снижение более чем в 100 раз вирусной нагрузки в группах вакцинированных животных по сравнению с группой плацебо на 6-е сутки после заражения. Вирус элиминировался из верхних дыхательных путей на 4 сут раньше, чем в плацебо группе. Статистически значимо снижает индекс массы легкие/тело, что указывает на защиту легких от тяжелой воспалительной реакции.

Таблица 4

Протективность вакцинных композиций пептидных иммуногенов против коронавируса SARS-CoV-2 штамм nCov/Victoria/1/2020. Доза заражения 10^3

ФОЕ интраназально. Хорьки

Номер группы	Номер животного	Вирусная нагрузка в носовом смыве, Ct				Индекс массы легкие/тело
		2 сут п.з.	4 сут п.з.	6 сут п.з.	8.сут п.з.	
Гр.1 Композиция пептидных иммуногенов №1 по п.9	1	21,22	22,53	28,25	>40	0,0091
	2	23,41	21,19	26,87	32,37	0,0102
	3	22,13	23,87	29,18	31,3	0,0088
	4	24,13	18,33	26,94	32,27	0,0069
	5	23,27	15,42	24,49	33,34	0,0073
СЗ		22,8	20,3	27,1	34,1	0,0085
ДИ95		0,90	2,66	1,39	3,10	0,0011
Гр.2 Композиция пептидных иммуногенов №2 по п.10	6	24,12	24,39	32,7	>40	0,0089
	7	27,03	26,23	>40	>40	0,0071
	8	21,06	30,01	26,67	32,19	0,0091
	9	22,13	24,61	27,07	>40	0,0095
	10	29,26	34,07	32,76	>40	0,0079
СЗ		24,7	27,9	32,0	39,2	0,0085
ДИ95		2,67	3,24	4,55	3,09	0,0008
Гр.3 Композиция пептидных иммуногенов №3 по п.11	11	23,63	24,08	22,58	>40	0,0081
	12	19,12	22,12	17,84	24,15	0,0141
	13	23,33	21,44	24,47	>40	0,0068
	14	26,18	23,02	29,19	>40	0,0082
	15	22,91	25,17	27,62	>40	0,0092
СЗ		23,0	23,2	24,3	37,6	0,0093
ДИ95		1,99	1,17	3,50	5,91	0,0022
Гр.4 Композиция пептидных иммуногенов №4 по п.12	16	18,37	21,23	23,7	>40	0,0069
	17	20,97	22,16	28,68	>40	0,0091
	18	22,01	27,24	31,58	>40	0,0073
	19	22,06	30,94	>40	>40	0,0105
	20	17,89	28,05	26,06	>40	0,0089
СЗ		20,3	25,9	30,2	>40	0,0085
ДИ95		1,57	3,22	5,26		0,0011
Гр.5 Плацебо	21	22,48	21,79	22,24	23,4	0,012
	22	22,3	24,07	18,78	23,79	0,0101
	23	21,53	17,98	17,34	17,03	0,0123
	24	24,57	14,32	17,99	20,79	0,0096
	25	25,71	26,84	28,26	23,63	0,011
СЗ		23,3	21,0	20,9	21,7	0,0110
ДИ95		1,37	3,88	3,54	2,27	0,0009

Примечания. СЗ - Среднее значение по группе. Для расчета СЗ при Ct>40 присваивали значение Ct=41; ДИ95 - 95%-ный доверительный интервал; Плацебо – физиологический раствор 0,9% хлорида натрия.

Источники научно-технической и патентной информации

1. Tyrrell D.A.J., Bynoe M.A. Cultivation of novel type of commoncold virus in organ culture. Br. Med. J. - 1965. - №1. - P. 1467-1470.

2. Вирусология под редакцией Филдса Б. и Найпа Д.М: Мир, 1989, том 3.
3. Tyrrell D.A.J., Almeida I.D. Direct electron microscopy of organ cultures for the detection and characterization of viruses // Arch. Gesamte Virusforsch. - 1967. - №22. - P. 417-425.
4. Siddell S.G., Wege H., ter Meulen V. The biology of coronaviruses // J Gen. Virol. - 1983. - №63. - P. 761-776.
- 5 - 15 5. Sturman L.S., Holmes K.V. The molecular biology of coronaviruses // Adv. Virus Res. №28. - P.35-112.
6. Coronavirus never before seen in humans is the cause SARS. 2003. Сайт ВОЗ. <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr31/en/print.html>.
- 10 7. Enserink M. SARS: chronology of the epidemic, (англ.) // Science (New York, N.Y.). - 2013. - 15 March (vol. 339, no. 6125). - P. 1266-1271. -doi:10.1126/science.339.6125.1266.
8. Huang C, Wang Y., Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // Lancet. - 2020. - Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- 15 9. Peiris J.S.M, Guan Y., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome // Nat Med. - 2004;10 (suppl 12):S88-S97. DOI: 10,1038 / nm1143.
10. CDC, 2019 Novel Coronavirus, Wuhan, China. CDC. Available at <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/index.html>.; Accessed: January 27, 2020.
11. Hui D.S.I., Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., et al The Continuing 2019-
20 nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China // Int. J. Infect. Dis. - 2020 Jan 14.91:264-266.
12. Larson H.E., Reed S.E., Tyrrell D.A.J. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 coldsin adults // J. Med. Virol. - 1980. - №5. - P. 221-229.
13. Yin Y., Wunderink R.G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia//
25 Respirology. -2018 Feb; 23(2):130-137. doi: 10.1111/resp.13196. Epub 2017 Oct 20.
14. Wege H., Siddell S., ter Meulen V. The biology and pathogenesis of coronaviruses // Curr. Top.Microbiol. Immunol. - 1982. - 99. - P, 165-200.
15. Risri H., Hovi T. Coronavirus infections of man associated with diseases other than the common cold // J. Med. Virol. - 1980. - №6. - P. 385-399.
- 30 16. Информационный Экспресс-Бюллетень. Коронавирус SARS-возбудитель атипичной пневмонии (временные методические рекомендации). - СПб-Москва, 2003.
17. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия // Под редакцией О.И. Киселева, И.Г. Маринича, А.А. Сомининой). - СПб.: «Боргес», 2003.
- 35 18. Постановление Правительства РФ от 01.12.2004 №715.
19. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March. Available from URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19>, 11 march 2020 (accessed April 2020).
- 40 20. Callegos A. WHO Declares Public Health Emergency for novel coronavirus // Medscape medical news. Available at <https://www.Medscape.com/viewarticle/924596>; Accessed: January 31, 2020.
21. Ramzy A., McNeil D.G. W.H.O. Declares Global Emergency as Wuhan Coronavirus Spreads // The New York Times. Available at <https://nyti.ms/2RER70M>; Accessed: January 30,
45 2020.
22. The New York Times. Coronavirus Live Updates: W.H.O. Declares Pandemic as Number of Infected Countries Crows. The New York Times. Available at <https://www.nytimes.com/2020/03/11/world/coronavirus-news.html#link-282e5b06>. Accessed: March 11, 2020.

23. Сайт ВОЗ https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf?sfvrsn=b8e4a30_4&download=true.

24. Заявка США №20060257852, МПК C07K 14/165, опублик. 16.11.2006 г. (аналог).

25. WO 2015/042373, A1, Immunogenic middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) compositions and methods, 2015. (прототип).

26. Wang, Q. et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. // ACS Infect. Dis. 2, 361-376 (2016).

27. Chen, W.H. et al. Optimization of the production process and characterization of the yeast-expressed SARS-CoV recombinant receptor-binding domain (RBD219-N1), a SARS vaccine candidate. // J. Pharm. Sci. 106,1961-1970 (2017).

(57) Формула изобретения

1. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцинной композиции против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, содержащей антигенные Т- и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

2. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, содержащей антигенные Т- и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

3. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, содержащей антигенные Т- и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

4. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, содержащей антигенные Т- и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

5. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, содержащей антигенные Т- и В-клеточные эпитопы белка S коронавируса SARS Cov-2, которые способны индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

6. Пептидный иммуноген, используемый в качестве компонента вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, содержащей участок белка S коронавируса SARS Cov-2, который обладает способностью индуцировать образование антител, обладающих антигенспецифической, вируснейтрализующей и протективной активностями.

7. Вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19, характеризующаяся тем, что содержит пептидные иммуногены по пп. 2 и 4, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5, а также пептидный иммуноген, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; содержит
- 5 пептидные иммуногены по пп. 1, 3 и 5, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; содержит пептидные иммуногены по пп. 3 и 5, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; или содержит пептидные иммуногены по пп. 3 и 6, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 7 соответственно и ковалентно
- 10 связанные в виде конъюгатов с белком-носителем, представляющим собой химерный рекомбинантный белок MBP-6xHis-N_nCoV-2019, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, причем смесь вышеуказанных конъюгатов пептидных иммуногенов и вышеуказанного белка-носителя сорбирована на фармацевтически приемлемый адъювант.
- 15 8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что конъюгаты пептидных иммуногенов с белком-носителем взяты в равных соотношениях между собой и белком-носителем.
9. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что в качестве адъюванта она содержит гидроокись алюминия в количестве 0,2-2 мг/мл.

20

25

30

35

40

45

ПРИЛОЖЕНИЕ

<110> Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

<120> Пептидные иммуногены, химерный рекомбинантный белок-носитель MBR-6xHis-N₂CoV-2019 и вакцинальная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19 с использованием пептидных иммуногенов и химерного рекомбинантного белка-носителя (варианты)

<160> Номер SEQ ID NO: 1

<210> 9

<211> 20

<212> peptide

<213> Искусственная последовательность

<223> Искусственно синтезированный пептид

<400> 1 Искусственная аминокислотная последовательность

RGVYYDPDKVFRSSVLHSTQD

<160> Номер SEQ ID NO: 2

<210> 9

<211> 22

<212> peptide

<213> Искусственная последовательность

<223> Искусственно синтезированный пептид

<400> 2 Искусственная аминокислотная последовательность

CTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFK

<160> Номер SEQ ID NO: 3

<210> 9

<211> 26

<212> peptide

<213> Искусственная последовательность

<223> Искусственно синтезированный пептид

<400> 3 Искусственная аминокислотная последовательность

RGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD

<160> Номер SEQ ID NO: 4

<210> 9

<211> 24

<212> peptide

<213> Искусственная последовательность

<223> Искусственно синтезированный пептид

<400> 4 Искусственная аминокислотная последовательность

RLFRKSNLKPFERDISTEIQAGS

<160> Номер SEQ ID NO: 5

<210> 9

<211> 20

<212> peptide

<213> Искусственная последовательность

<223> Искусственно синтезированный пептид

<400> 5 Искусственная аминокислотная последовательность
DQLTPTWRVYSTGSNVFQTR

<160> Номер SEQ ID NO: 6
<210> 9
<211> 21
<212> peptide
<213> Искусственная последовательность
<223> Искусственно синтезированный пептид
<400> 6 Искусственная аминокислотная последовательность
KNLNESLIDLQELGKYEQYIK

<160> Номер SEQ ID NO: 7
<210> 9
<211> 31
<212> peptide
<213> Искусственная последовательность
<223> Искусственно синтезированный пептид
<400> 7 Искусственная аминокислотная последовательность
KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK

<160> Номер SEQ ID NO: 8
<210> 9
<211> 817
<212> recombinant chimeric protein
<213> Искусственная последовательность
<223> Искусственно синтезированный рекомбинантный химерный белок
<400> 8 Искусственная аминокислотная последовательность

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLE	45
EKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKL	90
YPFTWDAVRNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPA	135
LDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIK	180
DVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAM	225
TINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGLSAGINAA	270
SPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKD	315
PRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDE	360
ALKDAQTNSSSNNNNNNNNNNLGIEGRGGSGHHHHHSGSDNGPQ	405
NQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASW	450
FTALTQHGKEDLKFRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGG	495
DGKMKDLSRWFYFYLGTPGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTP	540
KDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPGGFYAEGSRGGSQASSRSS	585
SRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLDRLNQLES	630
KMSGKGGQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRR	675
GPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGM	720
EVTSPGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTTE	765
PKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDLSKQLQQSMS	810
SADSTQA	817

<160> Номер SEQ ID NO: 9
<210> 9
<211> 2454
<212> recombinant chimeric gen

<213> Искусственная последовательность
 <223> Искусственно синтезированный рекомбинантный химерный ген
 <400> 9 Искусственная нуклеотидная последовательность

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGG	50
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAA	100
TTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATCCACAG	150
GTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCG	200
CTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACA	250
AAGCGTTCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTAC	300
AACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGAT	350
TTATAACAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGATCC	400
CGGCGCTGGATAAAGAAGCTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTT	450
AACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGG	500
TTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTGGGCG	550
TGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATT	600
AAAAACAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGC	650
CTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGT	700
CCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACC	750
TTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTAT	800
TAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAAC	850
ATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTG	900
GGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACG	950
TATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACA	1000
TCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAAC	1050
GCCGCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGAC	1100
TAATTCGAGCTCGAACAACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGA	1150
TCGAGGGAAGGGGAGGATCTGGCCACCATCATCATCATCATCTTGATCC	1200
GATAATGGACCCCAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGG	1250
ACCCTCAGATTCAACTGGCAGTAACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGGCGC	1300
GATCAAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGG	1350
TTACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATTCCTCGAGG	1400
ACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGATGACCAAATTGGCT	1450
ACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAA	1500
GATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGAAGC	1550
TGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTG	1600
AGGGAGCCTTGAATACACCAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCT	1650

AACAA TGCTGCAATCGTGCTACA ACTT CCTCAAGGAACAACATTGCCAAA	1700
AGGCTT TACGCAGAAGGGAGCAGAGGGCGG CAGT CAAGCCTCTTCTCGTT	1750
CCTCAT CACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAA ATT CAACTCCAGGCAGCAGT	1800
AGGGGA ACTTCTCCTGCTAGAA TGGCT GGAATGGCGGTGATGCTGCTCT	1850
TGCTTT GCTGCTGCTTGACAGATTGA ACCAGC TTGAGAGCAAAATGTCTG	1900
GTAAAG CCAACAACAACAAGGCCAA ACTG TCACTAAGAAATCTGCTGCT	1950
GAGGCT TCTAAGAAGCCTCGGCA AAAACG TACTGCCACTAAAGCATACAA	2000
TGTAAC ACAAGCTTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAA CAAA CCCAAGGAAATT	2050
TTGGGG ACCAGGAACTAATCAGACAAGGAA CTGAT TACAAACATTGGCCG	2100
CAAAT TGCACAATTTGCC CC CAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAA TGTC CGG	2150
CATTGG CATGGAAGTCACACCTTCGGGA ACGT GGTTGACCTACACAGGTG	2200
CCATCA AATTGGATGACAAAGATCCA AAT TTCAAAGATCAAGTCATTTTG	2250
CTGAAT AAGCATATTGACGCATACAA ACAT TCCACCAACAGAGCCTAA	2300
AAAGGA CAAAAAGAAGAAGGCTGATGAA ACT CAAGCCTTACCGCAGAGAC	2350
AGAAGA AACAGCAA ACTGT GACTCTTCTCCTGCTGCAGATTTGGATGAT	2400
TTCTCC AAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGT GCT GACTCAACTCAGGC	2450
CTAA	2454

Первый пептид: RGVYYPDKVFRSSVLHSTQD (SEQ ID NO: 1);
 Второй пептид: CTFEYVVSQPFLMDLEGKQGNFK (SEQ ID NO: 2);
 Третий пептид: RGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD (SEQ ID NO: 3);
 Четвертый пептид: RLFRKSNLKPFERDISTEIQAGS (SEQ ID NO: 4);
 Пятый пептид: DQLTPTWRVYSTGNSVNFQTR (SEQ ID NO: 5);
 Шестой пептид: KNLNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 6);
 Седьмой пептид: KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIK (SEQ ID NO: 7).

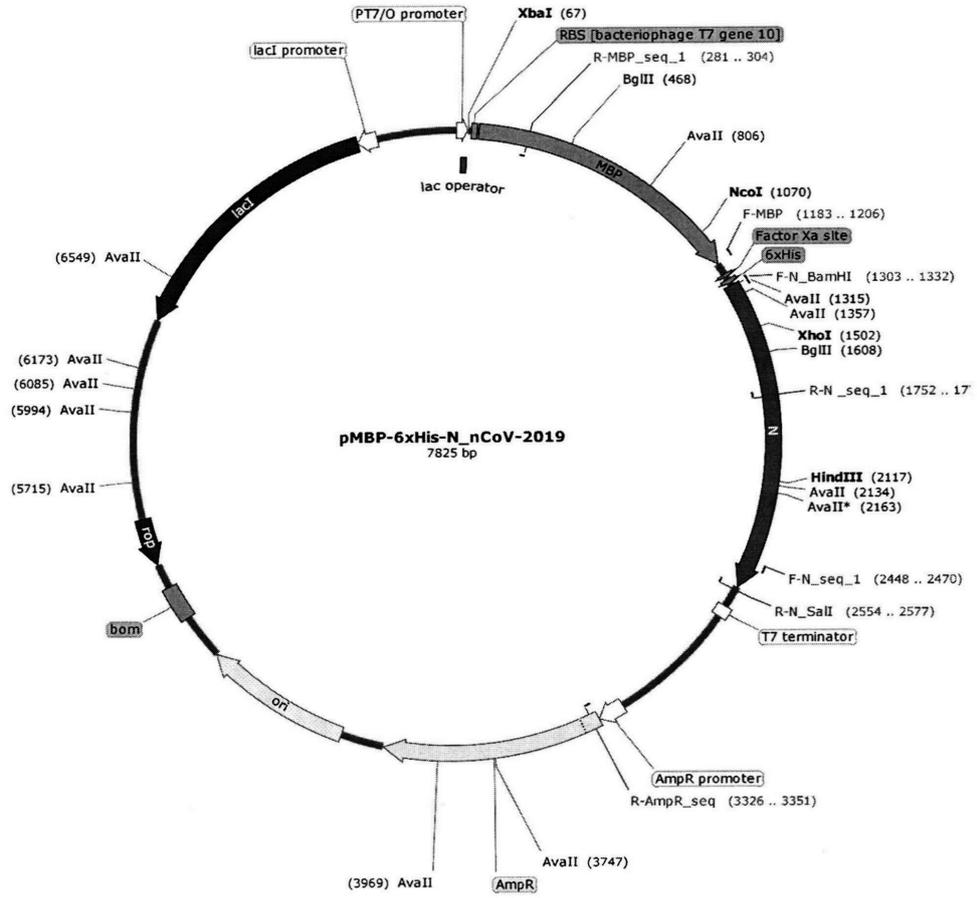
Фиг. 1

MKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWA
 HDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPK
 TWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDIKDVGVNAGAKAG
 LTFLVDLIKKNHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPFTFKGQPS
 KPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAA
 TMENAQKGEIMPNI PQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNNLGI
 EGRGGSGHHHHHSGSDNGPQQRNAPRITFGGSDSTGNSQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTA
SWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLG
TGPEAGLPYGANKDGI I WVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRG
GSQASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTS PARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKQQQQ
GQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQ
FAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKK
DKKKKADETQALPQRQKQQTVTLLPAADLDDLSKQLQQSMSSADSTQA*

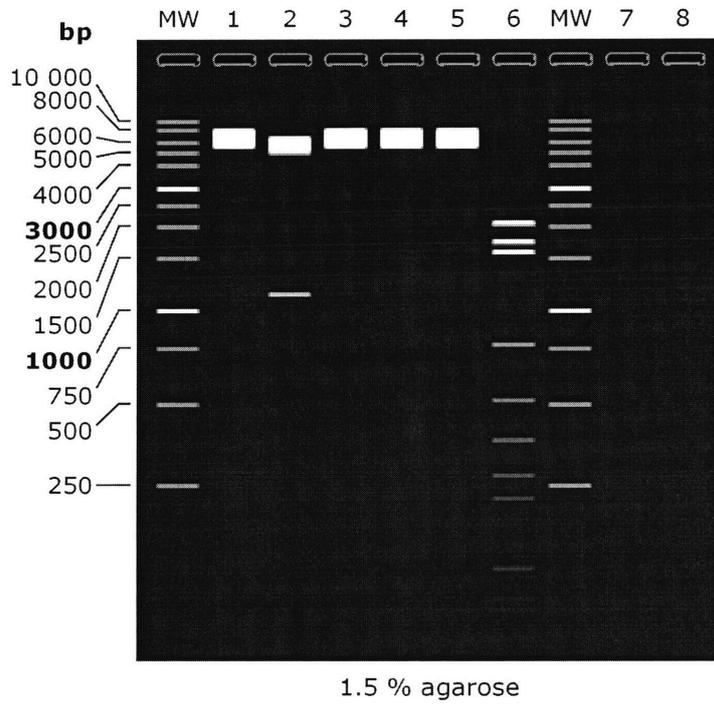
Фиг. 2

ATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAAG
 TCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATAACCGAATTAAGTCAACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAA
 ATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGC
 TACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTA
 CCTGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGAT
 TTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTG
 AAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTG
 CTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGC
 TGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAACAAACACATGAATGCAGACACCGAT
 TACTCCATCGCAGAAGTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGT
 CCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTCAAGGGTCAACCATCCAA
 ACCGTTTCGTTGGCGTGTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAGAGTTC
 CTCGAAAATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAG
 CGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCAGAA
 AGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAAC
 GCCGCCAGCGGTCTGAGACTGTGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGAACAACA
 ACAACAATAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGGAAGGGGAGGATCTGGCCACCATCATCATCATCA
 TTCTGGATCC**GATAATGGACCCCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCCTCAGAT**
TCAACTGGCAGTAACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTAC
CCAATAAACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATCCCTCGAGG
ACAAGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGA
CGAATTCGTGGTGGTACGGTAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTG
GGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTT
GAATACACCAAAAGATCACATGGCACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCTGCAATCGTGTACAACCTCCT
CAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCGAAGGGAGCAGAGGGCGGAGTCAAGCCTCTTCTCGTT
CCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGAACCTTCTCTGCTAG
AATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGC
AAAATGCTGGTAAAGGCCAACAAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTA
AGAAGCCTCGGCAAAAACGTACTGCCACTAAAGCATACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCC
AGAACAACCCCAAGGAAATTTTGGGGACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGATTACAACATTTGCCG
CAAATGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTCTTCGGAATGTGCGCATTGGCATGGAAGTCACAC
CTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCA
AGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTTCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAA
AAGAAGAAGGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACCTGTGACTCTTCTTC
CTGCTGCAGATTTGGATGATTTCTCAAACAATGCAACAATCCATGAGCAGTGTGACTCAACTCAGGC
 CТАА

Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5