

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247223 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **449432**

(22) Data zgłoszenia: **2022.10.10**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.04.15 BUP 16/24**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.02 WUP 22/2025**

(51) MKP:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło
wydzielenie:
442478

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA WARSZAWSKA, Warszawa, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MONIKA STANISZEWSKA, Warszawa, PL
JOANNA BARAN, Warszawa, PL
ŁUKASZ KURYK, Korchów Drugi, PL
MARIANGELA GAROFALO, Padua, IT
KATARZYNA WANDA PANCER, Warszawa, PL
ANNA MAZURKIEWICZ-PISAREK,
Warszawa, PL
ALINA MAZURKIEWICZ, Warszawa, PL
DIANA MIKIEWICZ, Warszawa, PL
TOMASZ CIACH, Warszawa, PL
EWA AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ,
Warszawa, PL
SYLWIA BRZEZIŃSKA, Warszawa, PL
AGNIESZKA IWAŃSKA, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Oliwia Czarnocka, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Kompozycja szczepionki do zastosowania w profilaktyce chorób zakaźnych

PL 247223 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku w dziedzinie biotechnologii jest kompozycja szczepionki do zastosowania w profilaktyce chorób zakaźnych, korzystnie COVID-19.

Dotychczasowe badane kompozycje szczepionek podjednostkowych zawierały m.in. białko RBD, zarówno RBD-dimer, białko S1-RBD, trimeryczną podjednostkę podobną do natywnej, białko S-2P + CpG 1018 jako antygeny oraz adiuwanty takie jak Advax™, MF59, fosforan glinu [10.3390/vaccines8040649], Chang-Monteagudo i wsp. [Chang-Monteagudo i wsp. A single dose of SARS-CoV-2 FINLAY-FR-1A dimeric-RBD recombinant vaccine enhances neutralization response in COVID-19 convalescents, with excellent safety profile. A preliminary report of an open-label phase 1 clinical trial. medRxiv 2021.02.22.21252091] w szczepionce zastosowali rekombinowaną dimeryczną domenę wiążącą receptor (d-RBD, 50 µg) na glinie (FINLAY-FR-1A).

Tatsis i wsp. pokazali, że utrzymujące się ilości limfocytów T CD8+ specyficznych dla produktu transgenu indukowane przez wektory adenowirusowe z defektem replikacji są powiązane z utrzymywaniem się niskich poziomów transkrypcyjnie aktywnych genomów wektorów adenowirusowych w miejscu inokulacji, w wątrobie i tkankach limfatycznych. Stale wytwarzane niewielkie ilości antygeny utrzymują w pełni aktywne efektorowe limfocyty T CD8+, jednocześnie umożliwiając ich różnicowanie w centralne komórki pamięci. Długotrwałe utrzymywanie się wektorów adenowirusowych może być bardzo korzystne w przypadku ich stosowania jako szczepionki przeciwko patogenom w przypadku, których ochrona za pośrednictwem komórek T wymaga zarówno w pełni aktywowanych komórek T do natychmiastowej kontroli komórek zakażonych wirusem, jak i centralnych komórek T CD8+ pamięci, które, dzięki ich wyższej zdolności proliferacyjnej, najlepiej nadają się do eliminowania komórek zakażonych przez patogeny, które uciekły przed początkową falą efektorowych limfocytów T. Interpretacja sposobu z zastosowaniem niereplikujących wirusów: efektorowe limfocyty T CD8+ zapewniają odporność na infekcje wirusowe poprzez natychmiastowe działanie w miejscu wejścia wirusa; komórki efektorowe T: żyją krótko i mogą być utrzymywane długoterminowo jedynie za pomocą tradycyjnych szczepionek poprzez ciągłe szczepienie przypominające. Sposób z zastosowaniem niereplikujących adenowirusów pozwolił na wytwarzanie w pełni aktywnych efektorowych limfocytów T CD8+, jednocześnie umożliwiając ich różnicowanie w centralne komórki pamięci. Ograniczeniem tego sposobu było niewystarczające różnicowanie efektorowych limfocytów T CD8+ do centralnych komórek T CD8+ pamięci, które, dzięki ich wyższej zdolności proliferacyjnej, najlepiej nadają się do eliminowania komórek zakażonych przez patogeny, które uciekły przed początkową falą efektorowych limfocytów T.

Pomimo licznych publikacji dotyczących kompozycji szczepionek przeciwko COVID-19 [Mendonça SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT. Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1):97. Published 2021 Aug 5. doi : 10.1038/s41541-021-00356-x; Jain S, Batra H, Yadav P, Chand S. COVID-19 Vaccines Currently under Preclinical and Clinical Studies, and Associated Antiviral Immune Response. *Vaccines (Basel)*. 2020 Nov 3;8(4):649. doi: 10.3390/vaccines8040649. PMID: 33153096; PMCID: PMC7711779; Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, Lin SW, Bian A, Xiang ZQ, Iparraguirre A, Lopez-Camacho C, Wherry EJ, Ertl HC. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood*. 2007 Sep 15; 110(6): 1916–23. doi: 10.1182/blood-2007-02-062117. Epub 2007 May 17. PMID: 17510320; PMCID: PMC1976365] nadal brakuje skutecznych szczepionek zapewniających odpowiedź humoralną i komórkową z udziałem centralnych komórek T CD8+ pamięci.

Nieoczekiwanie, twórcy wynalazku stwierdzili, że zastosowanie antygeny w postaci lentiwirusa pseudotypowanego białkami kolca SARS-CoV-2 (pseudowirus SARS-CoV-2, pseudo SARS CoV-2) i adiuwanta prowadzi do wytworzenia odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej komórek jednojądrowych wyizolowanych z krwi zdrowych dawców. Kompozycja indukuje proliferację i różnicowanie komórek T pamięci (CD4+), a w szczególności subpopulacji T_{CM} ze zdolnością do samoodnowy oraz odpowiedzi na wirusy. Kompozycja indukuje proliferację i różnicowanie subpopulacji limfocytów T pamięci: T_{EM} i T_{EMRA}, wykazujących działanie cytotoksyczne wobec patogenów. Kompozycja indukuje proliferację i różnicowanie subpopulacji limfocytów T cytotoksycznych (CD8+): T_{SCM} zdolnych do samodzielnego odnowienia i generowania subpopulacji zarówno T_{CM} i T_{EM}. Kompozycja indukuje proliferację i różnicowanie komórek B pamięci i efektorowych produkujących przeciwciała IgM i IgG. Kompozycja zapewnia długotrwałą pamięć immunologiczną.

ISTOTA WYNAŁAZKU

Kompozycja szczepionki według wynalazku zawiera antygen i adiuwant, przy czym antygen stanowi lentiwirus pseudotypowany białkami kolca SARS-CoV-2, a adiuwant stanowi niereplikujący adenowirus wybrany z grupy obejmującej AdV-D24-ICOSL-CD40L i AdV-D24-WT.

Korzystnie, kompozycja zawiera lentiwirusa pseudotypowanego białkami kolca SARS-CoV-2 w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100 VP/mL oraz AdV-D24-ICOSL-CD40L w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100VP/mL.

Korzystnie, kompozycja zawiera lentiwirusa pseudotypowanego białkami kolca SARS-CoV-2 w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100 VP/mL oraz AdV-D24-WT w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100VP/mL.

W kolejnym aspekcie wynalazek zapewnia kompozycję szczepionki do zastosowania w profilaktyce chorób zakaźnych, korzystnie COVID-19.

Niniejszy wynalazek zapewnia wiele korzyści.

W odróżnieniu od stanu techniki, wynalazek określa nowe kompozycje szczepionki, które korzystnie zawierają adiuwanty AdV-D24-ICOSL-CD40L (AdV1) oraz AdV-D24-WT (AdV2), niereplikujące w zdrowych komórkach, wzbudzające efektywnie zarówno odpowiedź komórkową (pamięci i cytotoksyczną) oraz humoralną układu immunologicznego, jednocześnie będąc nietoksycznymi dla komórek PBMC oraz komórek nabłonkowych VeroE6, co dowiedziono za pomocą testu określającego proliferację komórek (MTS, Promega) oraz programowaną śmierć komórek (barwienie Aneksyną V i jodkiem propidyny). Jednocześnie wynalazek powoduje zahamowanie replikacji ludzkiego betakoronawirusa HCoV-OC43, co potwierdzono przy użyciu analizy spektrofotometrycznej (Tabela 17). W przykładzie wykonania stosowano krioprezerwowaną zawiesinę komórek PBMC wyizolowanych z kożuchów leukocytnych zdrowych dawców (RCKiK Warszawa), co ogranicza wpływ różnic osobniczych na proliferację i różnicowanie poszczególnych populacji i subpopulacji komórek. Dzięki zastosowaniu 'odpoczynku' komórek oszacowano wyłącznie odpowiedzi komórek żywych, wynik nie jest zafałszowany przez martwe komórki oraz komórki w późnej fazie apoptozy, jak w sposobach, które uwzględniają natychmiastową analizę po pobraniu materiału oraz bezpośrednio po rozmrożeniu. Zastosowanie lipopolisacharydu zapewniło utrzymanie proliferacji komórek przez pełen czas trwania analiz. Dzięki optymalizacji stężeń poszczególnych składników kompozycji, szczepionki nie są toksyczne dla komórek. Zastosowanie niereplikujących adenowirusów jako adiuwantów oraz antygenów, w odróżnieniu od stanu literatury, zapewnia wzbudzenie subpopulacji centralnych komórek pamięci (T_{CM} CD4+) oraz cytotoksycznych (T_{SCM} CD8+), dzięki zdolności proliferacyjnej, najlepiej nadają się do eliminowania komórek zakażonych przez patogeny, które uciekły przed początkową falą efektorowych limfocytów T.

W odróżnieniu od stanu literatury, kompozycja szczepionki zapewnia indukowanie limfocytów centralnych pamięci (T_{CM} CD4+), które mogą przetrwać dłużej niż komórki efektorowe i mają zalety lokalizacji obwodowej i szybkiego efektorowego działania. Kompozycja indukuje centralne limfocyty T CD8+ pamięci są bardziej skuteczne niż efektorowe limfocyty T pamięci CD8+ w zmniejszaniu obciążenia wirusem. Komórki T_{SCM} CD8+ mają zdolność różnicowania w efektor i długotrwałe utrzymywanie się, a ich obecność w bramach wejściowych dla patogenów gwarantuje zdolności do ochrony przed infekcjami wirusowymi. Zapobiegają ucieczce patogenu poprzez mutacje przed nadzorem immunologicznym. Wynikiem są konkretne parametry liczbowe (Panel 3) uniemożliwiające porównanie danych pomiędzy doświadczeniami.

Opis figur

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia strategię bramkowania dla panelu 1 – reprezentatywne wykresy dla próby kontrolnej. Kolejno: Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów 197/95/8/4/45RA/3 All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów 197/95/8/4/45RA/3 All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – SINGLETY: CD3 APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD3+: CD8 PerCP – A oraz CD4 PE-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD8+: CD45RA APC-A oraz CD 197 BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD8 197+45RA+: CD95 PE-A oraz CD197 BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD4+: CD45RA APC-A oraz CD197

BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD4 197+45RA+: CD95 PE-A oraz CD197 BB515-A.

Fig. 2 przedstawia strategię bramkowania dla panelu 2 – wykresy reprezentatywne dla próbki kontrolnej. Kolejno: Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – SINGLET: SSC-A oraz CD19 BB700-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD19+: CD24 BB515-A oraz CD38 PE-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD38+CD24-: CD27 APC-A oraz CD20 APC-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD38-CD24+: CD27 APC-A oraz IgD PE-Cy7-A.

Fig. 3 przedstawia strategię bramkowania dla panelu 3 – reprezentatywne wykresy dla próbki kontrolnej.

Kolejno: Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – SINGLET; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CD19+: IgM BB515-A oraz CD38 PE-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CD38-CD24+: CD27 APC-A oraz IgD PE-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CS: IgM BB515-A oraz IgG APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – NCS: IgM BB515-A oraz IgG APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – NAIVE: IgM BB515-A oraz IgG APC-H7-A.

Fig. 4 przedstawia strategię bramkowania opisaną na fig. 1–3.

Fig. 5 przedstawia proliferację i vitalność komórek PBMC pod wpływem składowych kompozycji szczepionki (wyniki testu MTS).

Legenda: *all events* – wszystkie zdarzenia, *naive* – naiwne, *transitional* – przejściowe

Przykłady wykonania

Przykład 1. Sposób wytworzenia białka rRBD

Rekombinowane białko rRBD o sekwencji SEQ ID NO 1 (rRBD, rekombinowana domena wiążąca receptor, ang. *Receptor binding domain*) otrzymano w prokariotycznym systemie ekspresyjnym przy wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej. Sekwencja nukleotydowa genu RBD została zaprojektowana na podstawie sekwencji aminokwasowych dostępnych w literaturze. Wybrano specyficzny region białka kodującego wirusa SARS-CoV-2 o największym prawdopodobieństwie wywołania odpowiedzi immunologicznej (aminokwas 331–524 białka SARS-CoV-2 S). Do sekwencji genu RBD dodano na C-końcu sekwencję genu kodującą domenę foldon T4 (FT4), w celu zwiększenia prawdopodobieństwa prawidłowego złożenia struktury trzeciorzędowej białka. Znacznik 6-His na C-końcu genu umożliwił zastosowanie prostej metody chromatografii powinowactwa do oczyszczania białka. Dodano miejsca restrykcyjne (NdeI, XbaI). Sekwencję nukleotydową genów zoptymalizowano pod kątem wykorzystania kodonów bakteryjnych i wstawiono do wektora pUC57. Wektor pUC57 z sekwencją kodującą RBD+FT4+6Histag transformowano do kompetentnych komórek *E. coli* DH5 α i izolowano. Wektor pUC57 trawiono enzymami restrykcyjnymi NdeI/XbaI w 37°C zgodnie z instrukcjami producenta, a następnie rozdzielono na 1% żelu agarozowym. Wyizolowano strawiony fragment DNA o wielkości 696 pz. Do ligacji użyto wektora pT7 strawionego NdeI/XbaI (ligaza DNA T4) z fragmentem DNA strawionym enzymami restrykcyjnymi NdeI/XbaI zawierającym sekwencję genu rRBD. Mieszanie ligacyjną transformowano do kompetentnych komórek *Escherichia coli* NEB Turbo. Wektor ekspresyjny pT7/RBD transformowano przez elektroporację do komórek kompetentnych *E. coli*. Warunki hodowli: 37°C przez 1 godzinę, 600 rpm, pożywka LB, uzupełniona ampicyliną (100 μ g/ml). Płytki inkubowano w 37°C przez noc. Pojedynczą kolonię wyselekcjonowano i hodowano na 50 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny. Hodowlę prowadzono w 37°C z wytrząsaniem, aż gęstość optyczna (OD600) osiągnęła około 0,6–0,8 i zawieszono w 20% glicerolu w stosunku 1:1. Dobrano warunki hodowli dla szczepu ekspresyjnego *E. coli* (30°C, 18 godzin, pożywka LB). Rekombinowane białko RBD otrzymano w postaci ciałek inkluzyjnych. Opracowano metodę izolacji ciałek inkluzyjnych i oczyszczania rekombinowanego białka za pomocą chromatografii powinowactwa Ni-NTA. Po 18 godzinach hodowle wirowano (15000 x g przez 15 min w 4°C). Osad zawieszano w buforze do lizy (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,043% lizozymu, 1% inhibitora proteazy PMSF). Zawiesinę bakterii delikatnie mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 20 ml Triton X-100 i zawiesinę mieszano przez 10 min. Komórki poddano bzie w homogenizatorze wysokociśnieniowym i odwirowano przy 18400 x g przez 15 min w 4°C. Osady przemyto buforem (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl i 1%

Triton X-100) i ponownie odwirowano przy 18400 x g przez 15 min w 4°C. Następnie osady prze-myto dwukrotnie buforem (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl). Na koniec zawiesinę ciałek inkluzyjnych wirowano przy 15000 x g przez 15 min w 4°C. Ciałka inkluzyjne zawierające białko rRBD rozpuszczono w 50 mM buforze fosforanowym pH-12 z 7 M mocznikiem i 5 mM β-merkaptotetanolem i mieszano przez 45 min. w temperaturze pokojowej. pH roztworu doprowadzano do 8,0 za pomocą 5M HCl. Na koniec zawiesinę wirowano przy 24000 x g przez 15 min w 4°C w celu usunięcia nierozpuszczalnych resztek. Rekombinowany RBD oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu NiNTA Sepharose. Rekombinowane białko rRBD eluowano buforem: 50 mM bufor fosforanowy, 7 M mocznik, 300 mM NaCl i 300 mM imidazol. Po oczyszczeniu rRBD dializowano przez 24 godziny w 4°C, w celu renaturacji rekombinowanego białka (50 mM bufor fosforanowy pH 8,0, 10% glicerol).

- Gen rRBD poddano ekspresji w prokariotycznym wektorze *Escherichia coli*.
- Sekwencja genu RBD została zaprojektowana przy użyciu sekwencji aminokwasowych.
5' Met + RBD + FT4 + SerGlySer + 6HisTag + STOP 3' (232 aa = 696 pz; 26kDa; pi 7,7)
Met – start transkrypcji
SerGlySer – linker
FT4 – domena T4 (foldon) bakteriofaga T4 – (domena foldonowa) ułatwiająca prawidłowe tworzenie trzeciorzędowej struktury rekombinowanego białka
6HisTag – ułatwia oczyszczanie białek sposobem chromatografii powinowactwa (żywica NiNTA)
- Sekwencja nukleotydowa została zoptymalizowana pod kątem wykorzystania kodonów bakteryjnych. Zaprojektowano startery i syntetyczne oligonukleotydy, które wykorzystano do konstrukcji genu ze znacznikiem na N-końcu (zastosowano metodę chromatografii powinowactwa do oczyszczania rekombinowanych białek). Fragment genu fibryliny T4 kodujący domenę foldonu został dodany w celu ułatwienia prawidłowego tworzenia trzeciorzędowej struktury rekombinowanego białka. Sekwencję rekombinowanego białka (SEQ ID NO 1) podano poniżej.

MNITNLCPFGE VFNATRFASV YAWNKRKISN CVADYSVLYN SASFSTFKCY
GVSPTKLNDL CFTNVYADSF VIRGDEVROI APGQTGKIAD YNYKLPDDFT
GCVIAWNSNN LDSKVGGNYN YLYRLFRKSN LKPFERDIST EIQAGSTPC
NGVEGFNCYF PLQSYGFQPT NGVGYQPYRV VVLSFELLHA PATV GYIPEAPRDG
QAYVRKDGEW VLLSTFLSGSHHHHHH

- Prokariotyczny wektor ekspresyjny zawierający gen RBD transformowano do szczepu ekspresyjnego *E. coli* uzyskując białko rRBD w postaci ciałek inkluzyjnych. Zastosowano metodę oczyszczania rekombinowanego białka przy użyciu średniociśnieniowej chromatografii powinowactwa.

Przykład 2

Kompozycja szczepionki 1

Antygen rRBD	2,26 µg/mL lub 0,524 µg/mL
Adiuwant Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL	100 VP/mL lub 500 VP/mL
Medium OptiMem	500 µL

Kompozycję szczepionki wytwarza się poprzez wprowadzenie do medium OptiMEM w objętości 500 µL kolejno antygen rRBD w stężeniu 2,26 µg/mL lub 0,524 µg/mL oraz adiuwant Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL. W niniejszy sposób otrzymano 4 kompozycje szczepionki 1: kompozycję zawierającą 2,26 µg/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwanta, kompozycję zawierającą 2,26 µg/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwanta, kompozycję zawierającą 0,524 µg/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwanta oraz kompozycję zawierającą 0,524 µg/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwanta w 500 µL medium OptiMem.

Przykład 3

Kompozycja szczepionki 2

Antygen rRBD	2,26 µg/mL lub 0,524 µg/mL
Adiuwant Ad5/3-D24-WT	100 VP/mL lub 500 VP/mL
Medium OptiMem	500 µL

Kompozycję szczepionki wytwarza się poprzez wprowadzenie do medium OptiMEM w objętości 500 µL kolejno antygen rRBD w stężeniu 2,26 µg/mL lub 0,524 µg/mL oraz adiuwant adiuwant Ad5/3-

-D24-WT w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL. W niniejszy sposób otrzymano 4 kompozycje szczepionki 2: kompozycję zawierającą 2,26 µg/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 2,26 µg/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 0,524 µg/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu oraz kompozycję zawierającą 0,524 µg/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu w 500 µL medium OptiMem.

Przykład 4

Kompozycja szczepionki 3

Antygen pseudowirus SARS-CoV-2	100 VP/mL lub 500 VP/mL
Adiuwant Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL	100 VP/mL lub 500 VP/mL
Medium OptiMem	500 µL

Kompozycję szczepionki wytwarza się poprzez wprowadzenie do medium OptiMEM w objętości 500 µL kolejno antygen pseudowirusa SARS-CoV-2 w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL oraz adiuwant Adiuwant Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL. W niniejszy sposób otrzymano 4 kompozycje szczepionki 3: kompozycję zawierającą 100 VP/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 500 VP/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 100 VP/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu oraz kompozycję zawierającą 500 VP/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu w 500 µL medium OptiMem.

Przykład 5

Kompozycja szczepionki 4

Antygen pseudowirus SARS-CoV-2	100 µg/mL lub 500 VP/mL
Adiuwant Ad5/3-D24-WT	100 VP/mL lub 500 VP/mL
Medium OptiMem	500 µL

Kompozycję szczepionki wytwarza się poprzez wprowadzenie do medium OptiMEM w objętości 500 µL kolejno antygen pseudowirusa SARS-CoV-2 w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL oraz adiuwant adiuwant Ad5/3-D24-WT w stężeniu 100 VP/mL lub 500 VP/mL. W niniejszy sposób otrzymano 4 kompozycje szczepionki 4: kompozycję zawierającą 100 VP/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 500 VP/mL antygenu i 100 VP/mL adiuwantu, kompozycję zawierającą 100 VP/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu oraz kompozycję zawierającą 500 VP/mL antygenu i 500 VP/mL adiuwantu w 500 µL medium OptiMem.

Przykład 6

Badanie odpowiedzi limfocytów na kompozycję szczepionki 1

Sposób badania immunogenności nowych kompozycji szczepionki polegał na immunofenotypowaniu komórek PBMC wyizolowanych z kożuchów leukocytnych zdrowych dawców (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie), krioprezerwowanych w temp. od -196°C do -150°C. Zawiesinę komórek o określonej za pomocą wzoru 1 gęstości [c] :

$$c = n / V \text{ (Wzór 1)}$$

gdzie: c – gęstość komórek wyrażana w kom./mL
n – średnia ilość zliczonych komórek z 4 kwadratów komory,
V – objętość komory

immunizowano czynnikami immunogennymi o określonych stężeniach przygotowanych poprzez szereg rozcieńczeń (Tabela 1). Odpowiednimi czynnikami immunogennymi były składniki kompozycji szczepionki – antygeny w postaci rekombinowanej domeny wiążącej receptor (białko rRBD, ang. Receptor binding domain) lub pseudowirusa SARS-CoV-2 oraz adiuwanty w postaci adenowirusów Ad5/3-D24-ICOS-CD40L lub Ad5/3-D24-WT (Tabela 1), których stężenia przygotowywano zgodnie z Tabelą 1:

Tabela 1. Szereg rozcieńczeń czynników immunogennych (składników kompozycji szczepionki).

Antygen/ adiuwant	Stężenie wyjściowe	Stężenie przejściowe 1	Stężenie przejściowe 2	Stężenie przejściowe 3	Stężenie w kompozycji szczepionki
rRBD	100 µg/mL	-	-	-	2,62 lub 0,524 µg/mL
Pseudowirus SARS-CoV-2	1 x 10 ⁷ VP/mL	-	-	1 x 10 ¹ VP/mL	10 ² lub 50 ² VP/mL
Ad5/3-D24- ICOS-CD40L	5,2 x 10 ¹¹ VP/mL	5,2 x 10 ⁸ VP/mL	5,2 x 10 ⁵ VP/mL	1 x 10 ⁵ VP/mL	10 ² lub 50 ² VP/mL
AdV5/3-D24- WT	7,7 x 10 ¹² VP/mL	7,7 x 10 ⁹ VP/mL	7,7 x 10 ⁶ VP/mL	1 x 10 ⁵ VP/mL	10 ² lub 50 ² VP/mL

Po inkubacji w warunkach określonych w sposobie, określono ilość (%) komórek w poszczególnych populacjach przy pomocy cytometrii przepływowej. Komórki były znakowane przeciwciałami fluorescencyjnymi wg. protokołu producenta BD Horizon (tabela 2–4):

Tabela 2. Antygeny różnicowania komórkowego oraz bufor – panel 1.

Detektor	BB515	PE	PerCP	PE- Cy7	APC	APC- H7	Brilliant™ Stain Buffer	Stain Buffer (FBS)
Antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>)	CD197	CD95	CD8	CD4	CD45R A	CD3	-	-
Numer katalogowy (BD Biosciences)	56676 4	55567 4	34577 4	55785 2	550855	56017 6	566349	55465 6
Objętość użyta na 1 próbę badaną [µL]	2,5	10	10	2,5	10	2,5	10	2,5

Tabela 3. Antygeny różnicowania komórkowego oraz bufor – panel 2.

Detektor	BB515	PE	BB700	PE-Cy7	APC	APC-H7	Brilliant™ Stain Buffer	Stain Buffer (FBS)
Antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>) / antygen	CD24	CD38	CD19	IgD	CD27	CD20	-	-
Numer katalogowy (BD Biosciences)	56452 1	55546 0	56639 6	56131 4	55866 4	33582 9	566349	55465 6
Objętość użyta na 1 próbę badaną [μL]	2,5	10	2,5	2,5	10	2,5	10	10

Tabela 4. Antygeny różnicowania komórkowego oraz bufor – panel 3.

Detektor	BB515	PE	BB700	PE-Cy7	APC	APC-H7	Brilliant™ Stain Buffer	Stain Buffer (FBS)
Antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>) / antygen	IgM	CD38	CD19	IgD	CD27	IgG	-	-
Numer katalogowy (BD Biosciences)	56442 2	55546 0	56639 6	56131 4	55866 4	56129 7	566349	55465 6
Objętość użyta na 1 próbę badaną [μL]	2,5	10	2,5	2,5	10	2,5	10	10

Szczegółowy opis sposobu:

Medium hodowlane dla PBMC był OptiMEM buforowany HEPES i dwuwęglanem sodu (2,4 g/L), suplementowany L-glutaminą oraz zawierający czerwień fenolową oraz 10% inaktywowanej surowicy bydlęcej. Alternatywnie można było zastosować medium RPMI. Komórki PBMC rozmrażano w temperaturze pokojowej i zawieszono w 3–8 krotnej objętości medium OptiMEM. Następnie komórki liczone (wg Wzoru 1) i wysiano na płytkę 24-studzienkową w stężeniu $1-2,5 \times 10^6$ kom/studzienkę. 18–24 godzinna inkubacja rozmrożonych komórek PBMC w podłożu wzrostowym w temp. 35–37°C i 5% CO₂ zapewniła usuwanie apoptotycznych komórek z zawiesiny z komórek. Po inkubacji, medium hodowlane wymieniono na nową porcję w objętości 1 mL OptiMem. Kolejno do komórek podawano poszczególne czynniki immunogenne (składniki kompozycji szczepionki) w określonych stężeniach (wg Tabel 2–4) i inkubowano przez 24 godz. w 35–37°C i 5% CO₂. Dodatkowo do każdej studzienki, zarówno prób badanych, jak i kontrolnych, dodawano 0,5–1 µL lipopolisacharydu (LPS; 500x; eBioscience™), co odpowiadało stężeniu 1,25–1,5 µg/mL w celu pobudzenia proliferacji komórek PBMC i zwiększenia przeżywalności. Po inkubacji (24 godz. w 37°C i 5% CO₂), komórki odwirowano stosując następujący parametry: od 1276 do 1500 rpm przez 5 min; komórki zawieszano w 50 µL buforu CellWASH (BD) i barwiono przeciwciałami wyznakowanymi fluorescencyjnie przez 30 min. Przeciwciała dwukrotnie płukano za pomocą 2 mL buforu CellWASH (BD) i odwirowywano stosując parametry: 1276–1500 rpm przez 5 min. Supernatant usuwano i osad komórkowy zawieszano w 250 µL buforu CellWASH. Probówki mieszano na wstrząsarce i prowadzono cytometrię przepływową stosując średnią prędkość przepływu (BD FACSLytic™ Flow Cytometry System).

Etap 1 – PBMC i warunki hodowli

Zastosowano komórki PBMC wyizolowane od zdrowych dawców (RCKiK Warszawa). Komórki zastosowane w sposobie określenia odpowiedzi limfocytów przechowywano w medium do mrożenia (50% surowicy bydlęcej inaktywowanej termicznie Gibco, 50% medium OptiMEM Reduced Serum Medium Gibco) w temp. od -195°C -150°C. Przed badaniem komórki zawieszono w medium hodowlanym OptiMEM (Gibco) z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie surowicy bydlęcej (Gibco) i inkubowano w temp. od 35°C do 37°C przez 18 godz. Po inkubacji do każdej studzienki płytki 24-studzienkowej dodawano 0,5–1,25 µg/mL roztworu lipopolisacharydu (eBioscience™, nr kat. 00-4976-93).

Etap 2 – Czynniki immunogenne

Do immunizacji komórek zastosowano antygen w postaci biotechnologicznie wyprodukowanego i oczyszczonego rekombinowanego białka domeny wiążącej (rRBD) oraz adenowirusa zawierającego ligandy kostymulujące Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL. Czynniki immunogenne (tabela 5) zastosowane w sposobie badania odpowiedzi limfocytów przechowywano w probówkach do krioprezerwacji w temperaturze -80°C. Bezpośrednio przed badaniem, adiuwant rozcieńczono w medium hodowlanym OptiMEM (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej inaktywowanej termicznie (Gibco) stosując szereg rozcieńczeń zgodnie z tabelą 1.

Tabela 5. Czynniki immunogenne zastosowane w przykładzie 6.

Nazwa	Antygen/ adiuwant	Charakterystyka oraz stosowane stężenie	Referencja
Rekombino- wana domena wiążąca receptor (rRBD, ang. Receptor binding domain)	Antygen	Białko rRBD produkowane w bakteriach <i>E. coli</i> , oczyszczane przy użyciu średniociśnieniowej chromatografii powinowactwa. Użyte w stężeniu 2,26- 0,524 µg/mL.	SEQ ID NO 1 (niniejsze zgłoszenie)
Ad5/3-D24- ICOS- CD40L	Adiuwant	Adenowirus o chimerycznym serotypie 5/3 w którym domenę fiber knob 5 zastąpiono domeną fiber knob 3 w celu zwiększenia infekcyjności wobec komórek nowotworowych. Zawiera delecję 24bp w konserwowanym regionie “ <i>EIA Conserved Region 2</i> ”, która zapewnia selektywną replikację w komórkach neoplastycznych. Zawiera dwa ligandy kostymulujące CD40L oraz ICOSL.	[M., Bertinato, L.; Staniszewska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K. W.; Kuryk, L.. Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti- Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. <i>Pharmaceutics</i> . 04 2021 [dostęp: 29 08 2021]. 13(4). 547. doi: 10.3390/pharmaceutics1304054 7]

Etap 3 – Warunki hodowli komórek PBMC wyizolowanych z kożuchów leukocytarnych zdrowych dawców

Komórki PBMC wyizolowane z kożuchów leukocytarnych zdrowych dawców (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie), krioprezervowane w temp. -195°C do -150°C, rozmrażano w temp. pokojowej i zawieszano w trzykrotności-ośmiokrotności podłoża hodowlanego OptiMEM Reduced Serum Medium (Gibco) buforowanym HEPES i dwuwęglanem sodu (2,4 g/L), suplementowany L-glutaminą oraz zawierający czerwień fenolową oraz 10% inaktywowanej surowicy bydlęcej (Gibco™ 10270106). Kolejno komórki odwirowywano stosując parametry: 1276–1500 rpm przez 5min; supernatant usuwano, a osad zawieszano w nowej objętości 1 mL podłoża hodowlanego OptiMEM. Następnie, liczbę leukocytów (wg Wzoru 1) w ilości 1–3 x 10⁶/mL podłoża OptiMEM (10% surowicy bydlęcej) oszacowano w komorze Thoma przy użyciu odwróconego mikroskopu kontrastowo-fazowego (powiększenie 6,3/0,16 x 10; Leica, Niemcy). Komórki wprowadzano za pomocą pipety automatycznej (o pojemności 1 mL, Eppendorf Poland Sp. z o.o., Polska) w ilości 1 mL do każdej studzienki 24-studzienkowej płytki (Corning, Nowy Jork, NY, USA). Inkubację komórek PBMC prowadzono w inkubatorze (PHCBI Japonia) w temp. 35–37°C w atmosferze 5% CO₂ przez 18 godz.

Zawiesinę komórek jednojądrzastych oceniono przy użyciu odwróconego mikroskopu kontrastowo-fazowego (powiększenie 10/0,24 x 10; PZO, Warszawa, Polska). Po 18-godz. inkubacji płyn znad

hodowli zbierano za pomocą pipety automatycznej (o pojemności 1 mL, Eppendorf Poland Sp. z o.o., Polska) i wprowadzono 1000 μ L podłoża OptiMEM (zawierającego 10% surowicy bydlęcej).

Etap 4 – Przygotowanie roztworów oraz zawiesin czynników immunogennych – białko rRBD, Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL

Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL rozmrażano, a następnie wstrząsano i rozcieńczano stosując szereg rozcieńczeń wg. tabeli 6. Następnie z zawiesiny adiuwanta o stężeniu 1×10^5 VP/mL przenoszono objętości 1–5 μ L zawiesiny/studzienkę do studzienek 24-studzienkowej płytki hodowlanej zawierających PBMC, co odpowiada stężeniu 100–500 VP/mL. Białko rRBD o stężeniu 100 μ g/mL dodawano w ilości 26,2–5,24 μ L, co odpowiada stężeniu 2,62–0,524 μ g/mL.

Tabela 6. Szereg rozcieńczeń zastosowany w przykładzie 6.

Antygen/ adiuwant	Stężenie wyjściowe	Stężenie przejściowe 1	Stężenie przejściowe 2	Stężenie przejściowe 3	Stężenie w próbach badanych
rRBD	100 μ g/mL	-	-	-	2,62 lub 0,524 μ g/mL
Ad5/3-D24- ICOS-CD40L	$5,2 \times 10^{11}$ VP/mL	$5,2 \times 10^8$ VP/mL	$5,2 \times 10^5$ VP/mL	1×10^5 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL

Etap 5 – Immunizacja komórek PBMC.

Inkubację z czynnikami immunogennymi prowadzono przez 24 godz. w temp. 37°C w 5% CO₂. Następnie komórki zawieszono poprzez energiczne pipetowanie za pomocą pipety automatycznej Eppendorf o pojemności 100–1000 μ L. Próby następnie odwirowywano przy użyciu wirówki Eppendorf (5910 Ri) stosując parametry 1276–1500 rpm przez 5 min.

Supernatant usuwano, a osad komórkowy zawieszano w 150 μ L buforu CellWASH (BD Biosciences).

Etap 6 – Przygotowanie mieszanin przeciwciał do immunofenotypowania.

Wszystkie poniższe etapy 6–8 przygotowywano chroniąc przed światłem.

W próbkach marki Eppendorf przygotowywano mieszaniny przeciwciał do immunofenotypowania zgodnie z tabelami 2–4 zawierającymi iloczyn objętości przeciwciał podanych w poszczególnych kolumnach i liczbę analizowanych próbek. W pierwszej kolejności do próbek dodawano bufor Brilliant™ Stain Buffer i Stain Buffer (FBS). Po dodaniu wszystkich składników mieszaniny, roztwór krótko wstrząsano i porcjowano w objętości 50 μ L/probówkę Eppendorf o pojemności 2 mL.

Etap 7 – Immunofenotypowanie PBMC przy użyciu cytometrii przepływowej.

150 μ L zawiesiny komórek PBMC z etapu 5 porcjowano przy użyciu pipety automatycznej 10–100 μ L marki Eppendorf do próbek zawierających mieszaniny przeciwciał do immunofenotypowania (z etapu 6) w objętości 50 μ L/probówkę. Inkubowano chroniąc przed światłem przez 30 min w temp. pokojowej. Następnie do zawiesin dodawano 2 mL buforu CellWASH (BD Biosciences) i dwukrotnie płukano, poprzez odwirowanie przy użyciu wirówki marki Eppendorf w parametrach 1276–1500 rpm przez 5 min. Supernatant usuwano, a komórki zawieszano w 250 μ L buforu CellWASH (BD Biosciences). Tak przygotowane próbki są gotowe do analizy cytometrycznej. Analizy prowadzone były przy użyciu cytometru BD FACSLytic™ Flow Cytometry System. Przed każdą serią analiz wykonywano protokół Performance QC, jak zaleca producent. Stosowano strategię bramkowania jak na fig. 1–3. Hierarchia poszczególnych populacji przedstawiona jest na fig. 4.

Etap 8 – Zebranie wyników analiz cytometrycznych.

Określono ilość (%) komórek w poszczególnych populacjach przy pomocy cytometrii przepływowej stosując kolejność bramkowania:

Kolejno dla Panelu 1: Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów 197/95/8/4/45RA/3 All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji limfocytów 197/95/8/4/45RA/3 All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – SINGLETY: CD3 APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD3+: CD8 PerCP – A oraz CD4 PE-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD8+: CD45RA APC-A oraz CD197 BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD8 197+45RA+: CD95 PE-A oraz CD197 BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD4+: CD45RA APC-A oraz CD197 BB515-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 197/95/8/4/45RA/3 – CD4 197+45RA+: CD95 PE-A oraz CD197 BB515-A.

Kolejno dla Panelu 2: Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – SINGLET: SSC-A oraz CD19 BB700-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD19+: CD24 BB515-A oraz CD38 PE-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD38+CD24-: CD27 APC-A oraz CD20 APC-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji 24/38/19/IgD/27/20 – CD38-CD24+: CD27 APC-A oraz IgD PE-Cy7-A.

Kolejno dla Panelu 3: Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – All Events: SSC-A oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – All Events: FSC-H oraz FSC-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – SINGLET; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CD19+: IgM BB515-A oraz CD38 PE-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CD38-CD24+: CD27 APC-A oraz IgD PE-Cy7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – CS: IgM BB515-A oraz IgG APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG – NCS: IgM BB515-A oraz IG APC-H7-A; Ustawienie bramki na subpopulacji IgM/38/19/IgD/27/IgG-NAIVE: IgMBB515-A oraz IgG APC-H7-A

Poszczególne analizy cytometryczne przeprowadzono w 3–5 powtórzeniach biologicznych. Uśrednione wyniki przedstawiono w tabeli 7 pozycje a, b, c.

Tabela 7a. Uśrednione wyniki analiz cytometrycznych dla Panelu 1.

%	K		AdV1+Pseudo SARS-CoV-2		AdV2+Pseudo SARS-CoV-2		AdV1+rRED		AdV2+rRED	
	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe
Komórk: CD3 T	78.27	3.15	71.57	3.47	66.63	1.18	69.63	0.17	68.77	0.12
Komórk: CD4 T	72.6	2.84	70.87	0.68	55.17	2.45	55.4	0.71	54.87	1.31
Komórk: CD8 T	23.13	2.1	24.87	0.42	35.77	0.94	37.17	0.71	37.27	1.03
CD8 EMRA	39.77	4.83	46	5.76	57.57	3.16	50.17	1.34	49.4	1.04
CD8 EM	7.9	0.5	12.87	3.68	17.53	6.27	6.33	0.4	6.53	0.45
CD8 CM	4.07	0.82	3.07	1.14	1.33	0.05	3.03	0.26	2.97	0.19
Komórk: CD8 T CD197-CD45RA+	48.27	3.73	38.07	7.29	23.53	3.21	40.47	1.3	41.07	1.38
CD4 EMRA	2.13	0.84	2.83	0.74	9.63	0.9	6.87	0.56	6.57	0.49
CD4 EM	4.77	0.99	11.1	4.1	26.7	9.19	9.67	0.83	9.5	1.06
CD4 CM	14.5	1.47	18.73	2.33	19.07	0.47	21.5	0.79	21.83	0.65
CD4 CD197+ CD45RA+	78.63	0.87	67.3	6.85	44.6	9.62	61.93	0.62	62.1	1.28
CD8 SCM	6	1.77	6.83	1.73	2.27	0.33	8.57	0.77	9.23	0.34
CD8 NAIVE	41	5.74	29.57	5.15	21.27	2.88	30.97	0.79	30.97	0.96
CD4 SCM	11.23	3.3	13.2	0.99	5.7	1.98	13.53	0.76	14.03	0.42
CD4 NAIVE	67.1	4.66	53.67	7.42	38.73	7.73	48.13	0.87	47.93	0.93

Tabela 7b. Uśrednione wyniki analiz cytometrycznych dla Panelu 2.

	K		AdV1+pseudo-SARS-CoV-2		AdV2+pseudo-SARS-CoV-2		AdV1+rBD		AdV2+rBD	
	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe
%										
CD19 W LIMFOCYTACH	9.70	0.46	12.10	0.10	9.43	0.06	12.60	0.22	12.33	0.29
CD38-CD24+ W CD19	84.93	1.10	95.03	0.38	82.30	0.96	84.13	0.82	83.80	0.08
TRANSITIONAL W CD19	0.27	0.06	0.03	0.06	1.00	0.35	0.17	0.05	0.20	0.08
CD38+24- W CD19	0.03	0.06	0.00	0.00	0.17	0.06	0.00	0.00	0.07	0.05
CS W CD19	8.57	0.25	17.73	2.61	5.77	0.06	6.83	0.21	6.80	0.51
NCS W CD19	21.40	1.44	12.57	1.70	16.17	0.64	15.93	0.21	14.97	0.87
NAIVE W CD19	50.33	0.15	45.17	2.25	54.83	1.10	56.33	0.54	57.20	0.86

Tabela 7c. Uśrednione wyniki analiz cytometrycznych dla Panelu 3.

	Control		AdV1 + pseudovirus-SARS-CoV-2		AdV2 + pseudovirus-SARS-CoV-2		AdV1+ rRBD		AdV2 + rRBD	
	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe	średnia	odchylenie standardowe
CS_IgM+	33.36	1.06	23.50	2.50	29.49	1.77	36.18	0.31	32.13	1.08
CS_IgG+IgM+	0.23	0.00	5.01	2.00	2.24	0.54	0.20	0.14	0.29	0.25
CS_IgG-IgM	44.82	2.37	40.78	7.36	48.25	0.27	51.07	0.90	50.35	3.64
CS_IgG+	21.58	3.00	30.71	7.83	20.02	1.72	12.55	0.82	17.23	2.78
NCS_IgM+	61.12	1.43	29.29	10.02	38.25	1.70	51.75	1.60	49.70	1.36
NCS_IgG+IgM+	6.06	0.27	19.99	8.70	8.55	1.52	7.12	0.43	7.03	0.93
NCS_IgG-IgM-	29.39	1.87	31.75	6.79	44.01	3.62	35.39	1.36	37.13	0.88
NCS_IgG+	3.43	0.46	19.31	8.37	9.19	0.81	5.74	0.13	6.14	1.17
NAIVE_IgM+	20.38	1.56	16.17	3.08	20.05	1.16	13.88	0.41	13.82	0.63
NAIVE_IgG+IgM+	6.81	1.44	7.92	2.54	4.11	0.25	6.51	0.05	6.51	0.71
NAIVE_IgG-IgM-	63.82	3.63	65.98	3.84	71.85	0.87	67.99	0.26	67.41	0.42
NAIVE_IgG+	8.99	1.30	9.93	4.42	3.98	0.69	11.62	0.25	12.26	0.73

Przykład 7**Badanie odpowiedzi limfocytów na kompozycję szczepionki 3**

Badanie odpowiedzi przeprowadzano podobnie jak w przykładzie 6 oprócz etapu 2 i 4. W etapie 2 zastosowano czynniki immunogenne podane w poniższej tabeli 8.

Tabela 8. Czynniki immunogenne zastosowane w przykładzie 7.

Nazwa	Antygen/ adiuwant	Charakterystyka oraz stosowane stężenie	Referencja
Pseudowirus SARS-CoV-2 Genecopoeia	Antygen	Lentivirus, w którym glikoproteinę pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej G (VSV-G) zastępuje się białkiem kolca (S) z SARS-CoV-2. Stosowany w stężeniu 100 VP/mL.	[Tito, A., et al. (2021). Pomegranate Peel Extract as an Inhibitor of SARS-CoV-2 Spike Binding to Human ACE2 Receptor (in vitro): A Promising Source of Novel Antiviral Drugs. <i>Frontiers in Chemistry</i> doi: 10.3389/fchem.2021.638187]
Ad5/3-D24- ICOS- CD40L	Adiuwant	Adenowirus o chimerycznym serotypie 5/3 w którym domenę fiber knob 5 zastąpiono domeną fiber knob 3 w celu zwiększenia infekcyjności wobec komórek nowotworowych. Zawiera delecję 24bp w konserwowanym regionie "E1A Conserved Region 2", która zapewnia selektywną replikację w komórkach neoplastycznych. Zawiera dwa ligandy kostymulujące CD40L oraz ICOSL.	[M.; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K. W.; Kuryk, L.. Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. <i>Pharmaceutics</i> . 04 2021 [dostęp: 29 08 2021]. 13(4). 547. doi: 10.3390/pharmaceutics13040547]

W etapie 4 Ad5/3-D24-CD40L-ICOSL oraz pseudowirusa SARS-CoV-2 rozmrożono, a następnie wstrząsano i rozcieńczano stosując szereg rozcieńczeń z tabeli 9. Następnie z zawiesiny o stężeniu 1×10^5 VP/mL dodawano antygen i adiuwant do studzienek 24-studzienkowej płytki hodowlanej zawierających PBMC w objętości antygen 10–50 lub adiuwanta 1–5 μ L/studzienkę, co odpowiada stężeniu 100–500 VP/mL.

Tabela 9. Szereg rozcieńczeń zastosowany w przykładzie 7.

Antygen/ adiuwant	Stężenie wyjściowe	Stężenie przejściowe 1	Stężenie przejściowe 2	Stężenie przejściowe 3	Stężenie w próbach badanych
Pseudowirus SARS-CoV-2 Genecopoeia	1×10^7 VP/mL	-	-	1×10^4 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL
Ad5/3-D24- ICOS-CD40L	$5,2 \times 10^{11}$ VP/mL	$5,2 \times 10^8$ VP/mL	$5,2 \times 10^5$ VP/mL	1×10^5 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL

Poszczególne analizy cytometryczne przeprowadzono w 3–5 powtórzeniach biologicznych. Uśrednione wyniki przedstawiono w tabeli 7 a, b i c.

Przykład 8

Badanie odpowiedzi limfocytów na kompozycję szczepionki 3

Badanie odpowiedzi przeprowadzono podobnie jak w przykładzie 6 oprócz etapu 2 i 4. W etapie 2 zastosowano czynniki immunogenne podane w poniższej tabeli 10.

Tabela 10. Czynniki immunogenne zastosowane w przykładzie 8.

Nazwa	Antygen/ adiuwant	Charakterystyka oraz stosowane stężenie	Referencja
Rekombinowa domena wiążąca receptor (rRBD, ang. Receptor binding domain)	Antygen	Białko rRBD produkowane w bakteriach <i>E. coli</i> , oczyszczane przy użyciu średniociśnieniowej chromatografii powinowactwa. Stosowane w stężeniu: 2,24 $\mu\text{g/mL}$ lub 0,524 $\mu\text{g/mL}$.	Niniejsze zgłoszenie
AdV5/3- D24-WT	Adiuwant	Adenowirus o chimerycznym serotypie 5/3 w którym domenę fiber knob 5 zastąpiono domeną fiber knob 3 w celu zwiększenia infekcyjności wobec komórek nowotworowych. Zawiera delecję 24bp w konserwowanym regionie " <i>F1A Conserved Region 2</i> ", która zapewnia selektywną replikację w komórkach neoplastycznych. Nie posiada ligandów kostymulujących.	M.; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Wiczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K. W.; Kuryk, L.. Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. <i>Pharmaceutics</i> . 04 2021 [dostęp: 29 08 2021]. 13(4). 547. doi: 10.3390/pharmaceutics1304054 7

W etapie 4 Ad5/3-D24-WT rozmrożono, a następnie wstrząsano i rozcieńczano stosując szereg rozcieńczeń z tabeli 11. Następnie z zawiesiny o stężeniu 1×10^5 VP/mL dodawano adiuwant do studzienek 24-studzienkowej płytki hodowlanej z wysianymi PBMC w objętości 1–5 μ L/studzienkę, co odpowiada stężeniu 100–500 VP/mL. Białko rRBD o stężeniu 100 μ g/mL dodawano w ilości 26,2 lub 5,24 μ L, co odpowiada stężeniu 2,62 lub 0,524 μ g/mL.

Tabela 11. Szereg rozcieńczeń zastosowany w przykładzie 5.

Antygen/ adiuwant	Stężenie wyjściowe	Stężenie przejściowe 1	Stężenie przejściowe 2	Stężenie przejściowe 3	Stężenie w próbach badanych
rRBD	100 μ g/mL	-	-	-	2,62 lub 0,524 μ g/mL
AdV5/3-D24- WT	$7,7 \times 10^{12}$ VP/mL	$7,7 \times 10^9$ VP/mL	$7,7 \times 10^6$ VP/mL	1×10^5 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL

Poszczególne analizy cytometryczne przeprowadzono w 3–5 powtórzeniach biologicznych. Uśrednione wyniki przedstawiono w tabeli 7 a, b i c, przy czym AdV1 oznacza adenowirusa Ad5/3-D24-ICOS-CD40L, a AdV2 – adenowirusa AdY-D24-WT.

Przykład 9

Badanie odpowiedzi limfocytów na kompozycję 4

Badanie odpowiedzi przeprowadzano podobnie jak w przykładzie 6 oprócz etapu 2 i 4.

W etapie 2 zastosowano czynniki immunogenne podane w poniższej tabeli 12.

Tabela 12. Czynniki immunogenne w przykładzie 9.

Nazwa	Antygen/ adiuwant	Charakterystyka oraz stosowane stężenie	Referencja
Pseudowirus SARS-CoV- 2 Genecopoeia	Antygen	Lentivirus, w którym glikoproteinę pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej G (VSV-G) zastępuje się białkiem kolca (S) z SARS-CoV-2. Stosowany w stężeniu 100-500 VP/mL.	[Tito, A., et al. (2021). Pomegranate Peel Extract as an Inhibitor of SARS-CoV-2 Spike Binding to Human ACE2 Receptor (in vitro): A Promising Source of Novel Antiviral Drugs. <i>Frontiers in Chemistry</i> doi: 10.3389/fchem.2021.638187]

AdV5/3-D24-WT	Adiuwant	Adenowirus o chimerycznym serotypie 5/3 w którym domenę fiber knob 5 zastąpiono domeną fiber knob 3 w celu zwiększenia infekcyjności wobec komórek nowotworowych. Zawiera delecję 24bp w konserwowanym regionie “ <i>E1A Conserved Region 2</i> ”, która zapewnia selektywną replikację w komórkach neoplastycznych. Nie posiada ligandów kostymulujących.	[M.; Bertinato, L.; Staniszewska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K. W.; Kuryk, L.. Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. <i>Pharmaceutics</i> . 04 2021 [dostęp: 29 08 2021]. 13(4). 547. doi: 10.3390/pharmaceutics13040547]
---------------	----------	--	---

W etapie 4 Ad5/3-D24-WT oraz pseudowirusa SARS-CoV-2 (Genecopoeia) rozmrożono, a następnie wstrząsano i rozcieńczano stosując szereg rozcieńczeń z tabeli 13. Następnie z zawiesiny o stężeniu 1×10^5 VP/mL przenoszono zawiesinę antygenu w objętości 10–50 μ L/ studzienkę lub zawiesinę adiuwanta w objętości 1–5 μ L/ studzienkę do studzienek 24-studzienkowej płytki hodowlanej zawierających PBMC, co odpowiada stężeniu antygenu i adiuwanta 100–500 YP/mL.

Tabela 13. Szereg rozcieńczeń zastosowany w przykładzie 9.

Antygen/ adiuwant	Stężenie wyjściowe	Stężenie przejściowe 1	Stężenie przejściowe 2	Stężenie przejściowe 3	Stężenie w próbach badanych
Pseudowirus SARS-CoV-2 Genecopoeia	1×10^7 VP/mL	-	-	1×10^4 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL
AdV5/3-D24- WT	$7,7 \times 10^{12}$ VP/mL	$7,7 \times 10^9$ VP/mL	$7,7 \times 10^6$ VP/mL	1×10^5 VP/mL	10^2 lub 50^2 VP/mL

Poszczególne analizy cytometryczne przeprowadzono w 3–5 powtórzeniach biologicznych. Uśrednione wyniki przedstawiono w tabeli 7 a, b, c.

Przykład 10

Kompozycja szczepionki nie wykazuje cytotoksycznego wpływu na komórki PBMC

Określono aktywność metaboliczną komórek Vero E6 pod wpływem kompozycji szczepionki przy użyciu testu MTS (Promega, USA). Do studzienek płytki 96-studzienkowej wprowadzono 100 μ L komórek Vero E6 o gęstości $1-5 \times 10^5$ komórek/mL podłoża wzrostowego OptiMem. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C z dodatkiem 5% CO₂ ze studzienek z monowarstwą komórek Vero E6 usunięto podłoże.

Do studzienek 1–5 w rzędzie A dodano 93,8 μL podłoża OptiMem wzrostowego, 1 μL Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L (stężenie wyjściowe $5,2 \cdot 10^{11}$ VP/mL) i 5,24 μL białka rRBD (stężenie wyjściowe 0,1 mg/mL). Do studzienek 1–5 w kolumnach B-H dodano 90 μL podłoża wzrostowego OptiMem, a następnie wykonano 10-krotne rozcieńczenia mieszaniny znajdującej się w studzienkach 1–5 rzędu A, poprzez szereg 10-krotnych rozcieńczeń zawiesiny w kolejnych rzędach płytki 96-studzienkowej, uzyskując stężenia zgodnie z poniższą tabelą 14.

Tabela 14. Stężenia składowych kompozycji szczepionki w poszczególnych studzienkach płytki 96-studzienkowej po rozcieńczeniu przez przenoszenie do kolejnych rzędów, test MTS (Promega, USA).

	1	2	3	4	5
A	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^9$ VP/mL, białko rRBD: 5,24 $\mu\text{g/mL}$				
B	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^8$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/mL}$				
C	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^7$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$				
D	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^6$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$				
E	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^5$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$				
F	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^4$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$				
G	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^3$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$				
H	Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^2$ VP/mL, białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{g/mL}$				

Legenda: A-H: rzędy płytki 96-studzienkowej, 1-5: kolumny płytki 96-studzienkowej.

Adenowirus Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L. VP - cząstki wirusa (ang. viral particles).

Skład kompozycji szczepionki użytej w studzienkach rzędu A:

D24-ICOSL-CD40L: $5,2 \cdot 10^{11} \cdot 1 \mu\text{L} / 100 \mu\text{L} = 5,2 \cdot 10^9$ VP/mL

rRBD: $100 \mu\text{g/mL} \cdot 5,24 \mu\text{L} / 100 \mu\text{L} = 5,24 \mu\text{g/mL}$

Jako kontrolę pozytywną przygotowano 4 studzienki z monowarstwą komórek Vero E6, do których dodano 100 μL podłoża wzrostowego OptiMem. Jako kontrolę negatywną przygotowano 1 studzienkę, do której wprowadzono 100 μL podłoża wzrostowego OptiMem.

Tabela 15. Wpływ składowych kompozycji szczepionki (rRBD + AdV I) na proliferację i vitalność komórek Vero E6, MTS (Promega, USA).

Skład próby		1	2	3	4	5	średnia	Prolifercja i vitalność komórek [%]	SD [%]
AdV I: $5,2 \cdot 10^9$ VP/ml białko rRBD: 5,24 $\mu\text{g/mL}$	A	0,08	0,10	-	-	-	0,09	7,53%	1,03%
AdV I: $5,2 \cdot 10^8$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/mL}$	B	1,27	1,27	1,06	1,15	1,10	1,17	94,61%	7,87%
AdV I: $5,2 \cdot 10^7$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$	C	1,18	1,21	1,16	1,15	1,26	1,19	96,36%	3,45%
AdV I: $5,2 \cdot 10^6$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$	D	1,24	1,28	1,14	1,19	1,04	1,18	95,33%	7,54%
AdV I: $5,2 \cdot 10^5$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/mL}$	E	1,45	1,18	1,15	1,05	1,17	1,20	97,26%	12,12%
AdV I: $5,2 \cdot 10^4$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$	F	1,33	1,07	1,31	1,15	1,13	1,20	96,73%	9,36%
AdV I: $5,2 \cdot 10^3$ VP/ml białko rRBD: $5,24 \cdot 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$	G	0,96	1,04	1,03	1,20	1,07	1,06	85,57%	7,34%

AdV I: 5,2*10 ² VP/ml białko rRBD: 5,24*10 ⁻⁷ μg/mL	H	0,95	1,05	1,15	1,09	1,06	1,06	85,62%	5,81%
Kontrola pozytywna		1,22	0,64	1,44	1,54		1,40	100,00%	13,17%

Legenda: Wyniki absorbancji zmierzonej dla badanych prób w poszczególnych studzienkach kolumn 1-5 płytki 96- studzienkowej przy długości fali 490 nm, po odjęciu wartości uzyskanej dla kontroli negatywnej (blank), średnie z uzyskanych wyników, obliczone procentowa proliferacja i witalność komórek względem kontroli pozytywnej (monowarstwa komórek Vero E6 nietraktowana), procentowe odchylenie standardowe. Wynik zaznaczony kolorem czerwonym został odrzucony. A-H: oznaczenie rzędu płytki 96-studzienkowej. Adenowirus Ad5/3-D24-ICOSL-CD40L; VP - cząstki wirusa (ang. viral particles).

Kompozycja szczepionki o składzie: AdV I: 5,2*10⁹ VP/ml + białko rRBD: 5,24 μg/mL (A w tabeli 14) hamowała proliferację komórek VERO E6 (7,53% ± 1,03% komórek wykazujących proliferację) w porównaniu do kontroli pozytywnej (100% ± 13,17% komórek wykazujących proliferację) komórek VERO E6 nie poddanych działaniu kompozycji szczepionki w żadnym z badanych stężeń. W pozostałych stężeniach składowych kompozycji szczepionki (B-H w tabeli 14) wykazano od 85,57% do 97,26% ± 12,12% proliferujących komórek VERO E6 w porównaniu do kontroli pozytywnej (100% ± 13,17% komórek wykazujących proliferację) komórek VERO E6 nie poddanych działaniu kompozycji szczepionki w żadnym z badanych stężeń.

Określono aktywność metaboliczną komórek PBMC pod wpływem kompozycji szczepionki przy użyciu testu MTS (Promega, USA). Do studzienek płytki 96-studzienkowej wprowadzono 100 μl komórek PBMC o gęstości 3x10⁶ komórek/mL podłoża OptiMem. Po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C z dodatkiem 5% CO₂ ze studzienek usunięto podłoże OptiMem. Do studzienek wprowadzono podłoże OptiMem i składowe kompozycji szczepionki w stężeniu podanym poniżej w tabeli 16. W tabeli 16 podano wyniki w postaci procentu komórek PBMC wykazujących proliferację pod wpływem zastosowanych stężeń poszczególnych składników immunogennych.

Tabela 16. Stężenia składowych kompozycji szczepionki w poszczególnych studzienkach płytki 96-studzienkowej, test MTS (Promega, USA).

Składowe kompozycji	Stężenia	(%) Komórek PBMC wykazujących proliferację
LPS	0,5 lub 1,25 μg/mL	81,06%-100%±3,86
AdV1	100 VP/mL	95,73%±3,3%
AdV2	100 VP/mL	88,30%±1,2%
pseudowirus	100 VP/mL	92,69%±2,7%
rRBD	2,62 μg/mL	100%±4,3%
HCoV-OC43	100 VP/mL	92,69%±0,96%
AdV1+rRBD	100 VP/mL+2,62 μg/mL	97,57%±10,28%
AdV2+rRBD	100 VP/mL+2,62 μg/mL	89,13%±4,5%
Kolec + Ab (IC50)	2,62 μg/mL +	96,48%±3,9%
pseudowirus +Ab (IC100)	100 VP/mL+2,62 μg/mL	100%±16,53%

Procent komórek PBMC wykazujących proliferację mieścił się w zakresie od $97,76\% \pm 3,3\%$ do $100\% \pm 16,53\%$ pod wpływem czynników immunogennych (Tabela 16) w porównaniu do kontroli komórek PBMC (indukowanych LPS w Tabeli 16) nie poddanych działaniu czynników immunogennych, procent proliferacji komórek kontrolnych wynosił od $81,06\%$ do $100\% \pm 3,86$. Zatem czynniki immunogenne nie wykazywały właściwości cytotoksycznych w badanych warunkach *in vitro*.

Przykład 7

Zweryfikowano wpływ kompozycji szczepionki według wynalazku na replikację ludzkiego betakoronawirusa HCoV-OC43. Kompozycja według wynalazku powodowała zahamowanie replikacji ludzkiego betakoronawirusa HCoV-OC43, co potwierdzono przy użyciu analizy spektrofotometrycznej (Tabela 17). Zgodnie z danymi podanymi w Tabeli 17 (dla 3 studzienki) miano wirusa HCoV-OC43 wynosiło $56,36\%$ po 7 dniach inkubacji na linii komórkowej VERO E6 w porównaniu do miana wirusa HCoV-OC43 w czasie 0 wynoszącego $126,41\%$. Ponadto, miano wirusa HCoV-OC43 inkubowanego na linii komórkowej VERO E6 przez 7 dni (studzienka 5) wynosiło $294,76\%$. Zatem obserwowano spadek miana wirusa OC43 po 7 dniach inkubacji na linii komórkowej, co związane było z hamującym wpływem adiuwantu AdV1 lub AdV2 na replikację wirusa HCoV-OC43.

Tabela 17 Wyniki pomiarów absorbancji dsDNA, RNA oraz ich procentowe ilości względem ilości nominalnych (Viral titer/nominal viral titer) dla poszczególnych studzienek płytki 24-dółkowej, spektrofotometria eksperyment 7-dniowy. Dzień 0: Pomiar zawiesin wirusowych w medium utrzymującym. Dzień 7: Pomiar po 7 dobach trwania eksperymentu. AdV1 – Adenowirus Ad5/3-D24-ICOS-CD40L; AdV2 – Adenowirus AdV-D24-WT; VP – cząstki wirusa (ang. viral particles).

Numer studzienki	Dzień pomiaru	Wirusy	Stężenie dsDNA (VP/ml)	Stężenie RNA (VP/ml)	Miano DNA wirusa (%)	Miano RNA wirusa (%)
1	Dzień 0	AdV1	$9,96 \cdot 10^{10}$	-	9,05	-
	Dzień 7		$2,01 \cdot 10^{12}$	-	183,07	-
2	Dzień 0	AdV2	$3,23 \cdot 10^{11}$	-	29,34	-
	Dzień 7		$2,43 \cdot 10^{12}$	-	220,79	-
3	Dzień 0	AdV1 + OC43	$9,96 \cdot 10^{10}$	$1,39 \cdot 10^{12}$	9,05	126,41
	Dzień 7		$4,95 \cdot 10^{12}$	$6,20 \cdot 10^{11}$	449,65	56,36
4	Dzień 0	AdV2 + OC43	$3,23 \cdot 10^{11}$	$1,39 \cdot 10^{12}$	29,34	126,41
	Dzień 7		$3,32 \cdot 10^{12}$	$5,96 \cdot 10^{11}$	301,92	54,21
5	Dzień 0	OC43	-	$1,39 \cdot 10^{12}$	-	126,41
	Dzień 7		-	$3,23 \cdot 10^{12}$	-	295,28
10-bez linii Vero E6	Dzień 7	AdV1	$2,11 \cdot 10^{12}$	-	191,66	-
11-bez linii Vero E6	Dzień 7	AdV2	$3,24 \cdot 10^{12}$	-	294,76	-
12-bez linii Vero E6	Dzień 7	OC43	-	$1,88 \cdot 10^{11}$	-	17,08

LISTA SEKWENCJI

<110> POLITECHNIKA WARSZAWSKA

<120> Kompozycja szczepionki do zastosowania w profilaktyce chorób zakaźnych

<130> 56464/22

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 231

<212> PRT

<213> Enterobacteria phage T4

<220>

<223> Sekwencja aminokwasowa rekombinowanej domeny wiążącej receptor z domeną foldonu fibrytyny T4

<400> 1

```

Met Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr
1           5           10           15
Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys
20           25           30
Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe
35           40           45
Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr
50           55           60
Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln
65           70           75           80
Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu
85           90           95
Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu
100          105          110
Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg
115          120          125
Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr
130          135          140
Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr
145          150          155          160
Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr
165          170          175
Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro
180          185          190
Ala Thr Val Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr
195          200          205
Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Ser Gly
210          215          220
Ser His His His His His His
225          230

```

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja szczepionki zawierająca antygen i adiuwant, **znamienna tym**, że antygen stanowi lentiwirus pseudotypowany białkami kolca SARS-CoV-2, a adiuwant stanowi niereplikujący adenowirus wybrany z grupy obejmującej AdV-D24-ICOSL-CD40L i AdV-D24-WT.
2. Kompozycja według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że zawiera lentiwirusa pseudotypowanego białkami kolca SARS-CoV-2 w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100 VP/mL oraz AdV-D24-ICOSL-CD40L w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100VP/mL.

3. Kompozycja według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że zawiera lentiwirusa pseudotypowego białkami kolca SARS-CoV-2 w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100 VP/mL oraz AdV-D24-WT w stężeniu od 100 do 500 VP/mL, korzystnie 100 albo 500 VP/mL, najkorzystniej 100VP/mL.
4. Kompozycja szczepionki określona w dowolnym z zastrzeżeń 1–3 do zastosowania w profilaktyce chorób zakaźnych, korzystnie COVID-19.

Rysunki

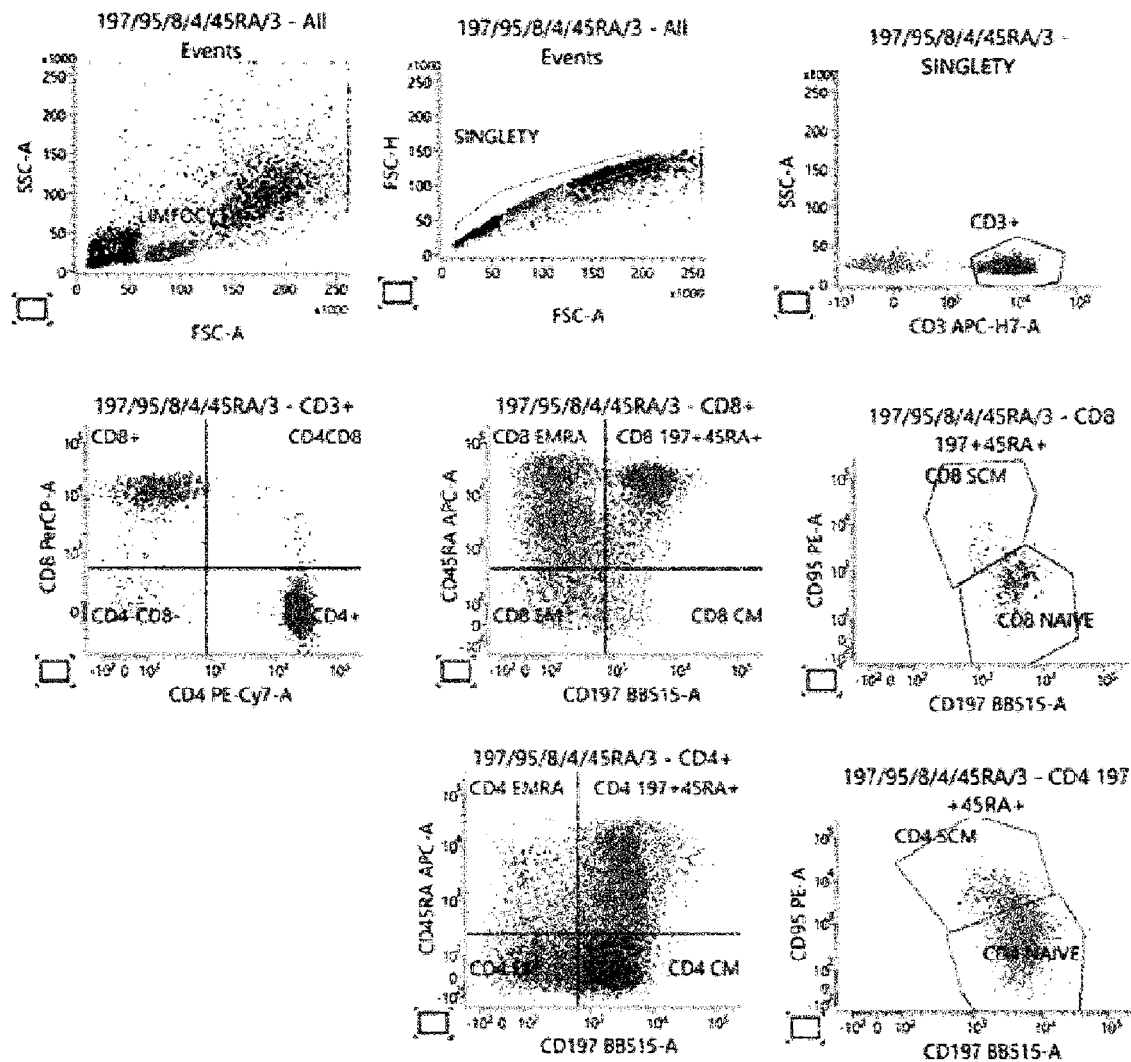


Fig. 1

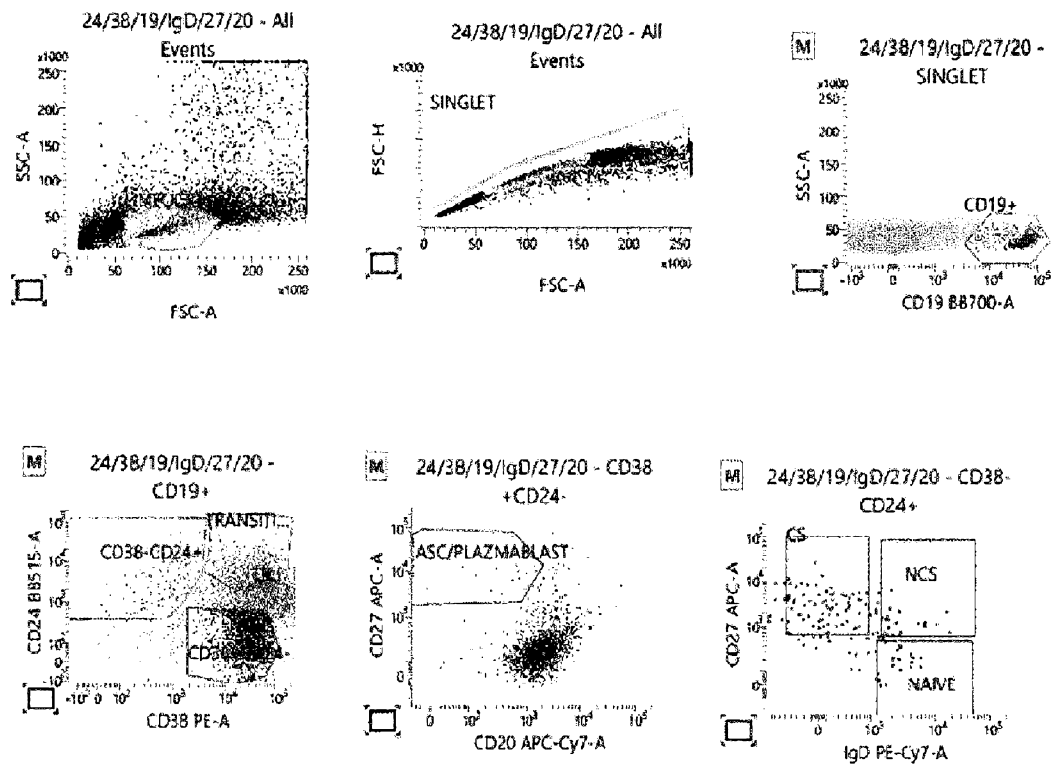


Fig. 2

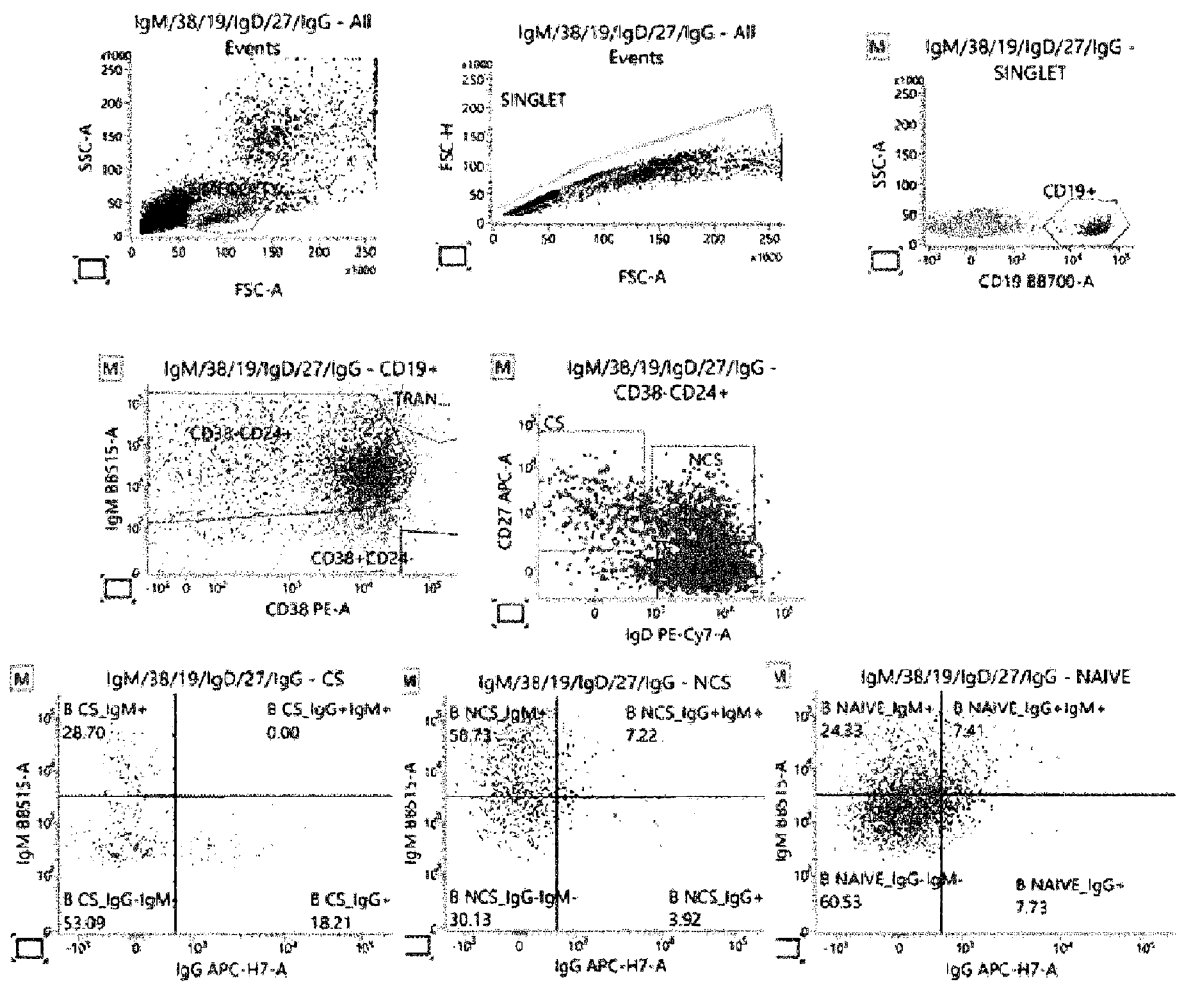


Fig. 3

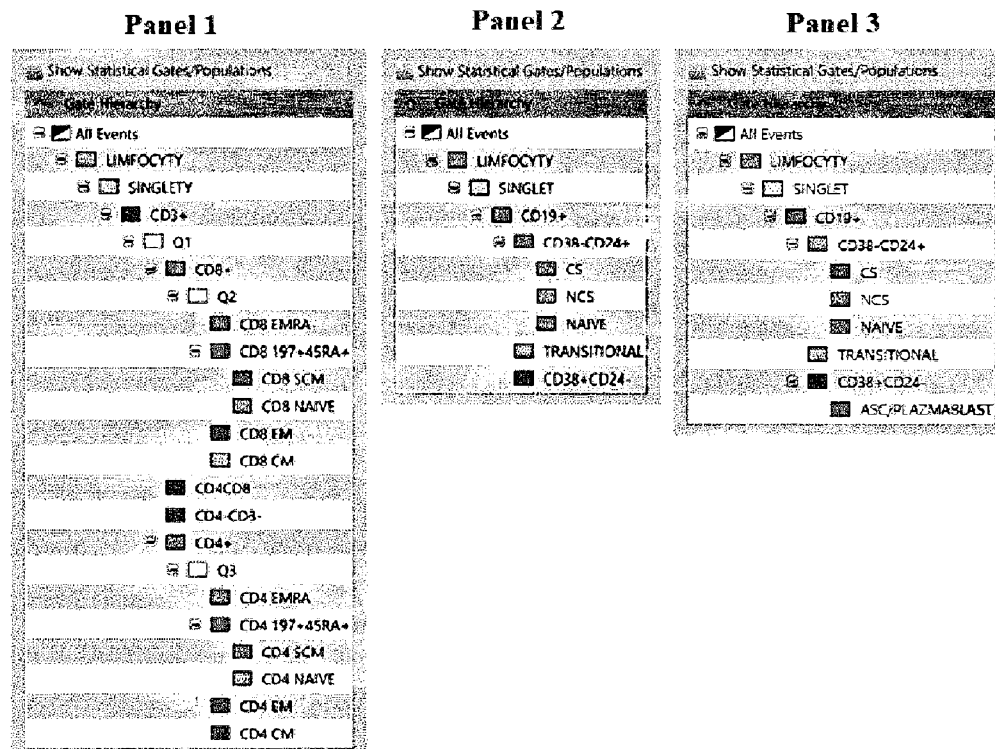


Fig. 4

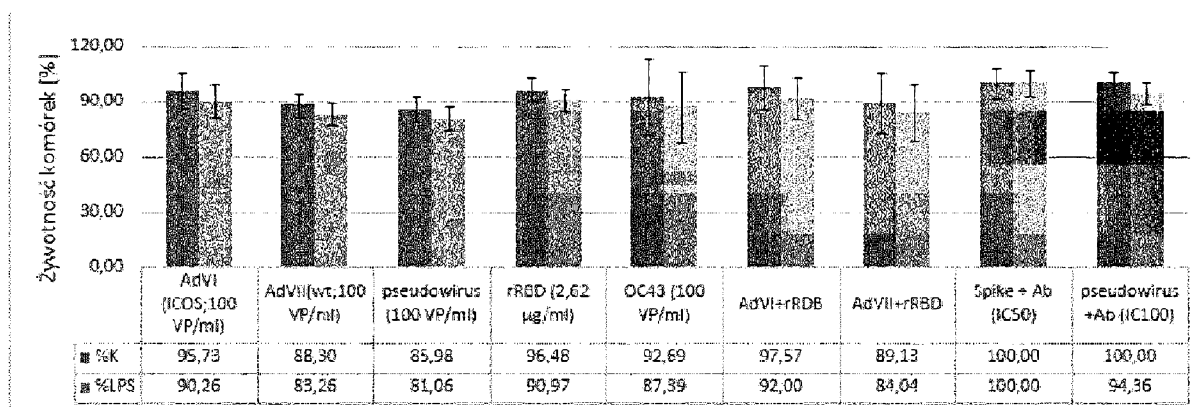


Fig. 5