

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037297**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.05

(21) Номер заявки
202000370

(22) Дата подачи заявки
2020.11.09

(51) Int. Cl. **A61K 39/215** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-COV-2 (ВАРИАНТЫ)

(31) **2020127980**

(32) **2020.08.22**

(33) **RU**

(43) **2021.03.02**

(86) **PCT/RU2020/000591**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

**Викторович, Гроусова Дарья
Михайловна, Джаруллаева Алина
Шахмировна, Тухватулин Амир
Ильдарович, Тухватулина Наталья
Михайловна, Щербинин Дмитрий
Николаевич, Есмагамбетов Илья
Булатович, Токарская Елизавета
Александровна, Ботиков Андрей
Геннадьевич, Ерохова Алина
Сергеевна, Ижаева Фатима
Магометовна, Семихин Андрей
Геннадьевич, Борисевич Сергей
Владимирович, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович (RU)**

(74) Представитель:
Месяшная Н.В. (RU)

(72) Изобретатель:
**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Должикова Инна Ваимовна,
Попова Ольга, Щедляков Дмитрий**

(56) **KR-B1-102050616
US-B1-6251677
WO-A2-2000012740
US-A1-20190134178
WO-A2-2010037027**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. Также создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. Создано также фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса

B1**037297****037297****B1**

тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. При этом каждое фармацевтическое средство находится в жидкой или лиофилизированной форме, а компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках. Каждое фармацевтическое средство применяют для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, при этом используют компонент 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели. Изобретение обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2, при этом обеспечивается повышенный уровень иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложенное средство может применяться для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Уровень техники

В конце 2019 г. в г. Ухань провинции Хубэй (КНР) была зафиксирована вспышка атипичной пневмонии неизвестной этиологии. Проведенные научные исследования позволили установить, что она была вызвана одноцепочечным РНК-содержащим вирусом, относящимся к семейству Coronaviridae, к линии Beta-CoV B. 11 февраля 2020 г. Всемирная Организация Здравоохранения присвоила новому вирусу официальное название SARS-CoV-2, а болезнь, возбудителем которой он является, получила название COVID-19 ("Coronavirus disease 2019").

В течение нескольких месяцев SARS-CoV-2 распространился по всему миру, став причиной пандемии, затронувшей более 200 стран. К 1 августа 2020 г. количество заболевших превысило 17,5 млн человек, а количество погибших - 683 тыс. человек.

Коронавирус передается от человека к человеку воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактным путями. Инкубационный период составляет в среднем 5-6 дней, после чего развиваются первые симптомы заболевания. Для COVID-19 характерными симптомами являются повышение температуры тела, сухой кашель, одышка, утомляемость. Реже встречаются - боль в горле, в суставах, насморк, головная боль.

Диагностика COVID-19 осложняется тем, что симптомы данного заболевания характерны для многих вирусных инфекций. Окончательный диагноз ставится на основании результатов лабораторных исследований, для которых необходимо специализированное оборудование, высококвалифицированный персонал и дорогостоящие реактивы.

COVID-19 может протекать как в легкой, так и тяжелой форме. При этом тяжелая форма заболевания чаще развивается у пациентов старше 60 лет, имеющих хронические заболевания. Наиболее грозными осложнениями данного заболевания являются пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии и др. При этом средств этиотропного лечения в настоящее время не разработано.

Быстрое распространение SARS-CoV-2 и высокий процент смертности создали острую необходимость в разработке эффективных средств профилактики заболеваний, вызываемых данным вирусом. Все исследования в данной области опираются на многолетний опыт по разработке препаратов для профилактики заболеваний, вызываемых другими представителями семейства коронавирусов.

Известно решение (патент US 7452542 B2), в котором для профилактики заболеваний, вызванных коронавирусом, используют живую аттенуированную вакцину. Данная вакцина содержит живой аттенуированный коронавирус, который характеризуется как содержащий геном, кодирующий (i) E_хN, содержащий замену на тирозин⁶³⁹⁸ MHV-A59 или аналогичной позиции, (ii) полипептид Orf2a, содержащий замену на лейцина¹⁰⁶ MHV-A59 или аналогичной позиции и фармацевтически приемлемый разбавитель. При этом данное изобретение распространяется на ряд коронавирусов животных и птиц и коронавирус человека OC34.

Известно решение (WO 2006136448 A2), в котором для получения вакцины против SARS-CoV используют нуклеиновую кислоту, кодирующую аттенуированный вирус SARS-CoV.

При этом максимальный титр вируса в клеточной культуре по крайней мере в 2 раза ниже, чем максимальный титр вируса SARS-CoV дикого типа в той же культуре клеток.

Известно решение (RU 2332457 C2B), в котором для профилактики коронавирусной инфекции, возбудителем которой является SARS-CoV, используют живую бактериальную вакцину, в которой на поверхности бактерии представлены антигены SARS-CoV, заякоренные с помощью синтетазы поли-гамма-глутаминовой кислоты (pgsBCA).

Известно решение (WO 2016116398 A1), где для получения вакцины против коронавируса MERS-CoV используют нуклеокапсидный белок N MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую N-нуклеокапсидный белок MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент. Также в изобретении раскрыто использование генетических векторов на основе вируса коровьей оспы, авиопоксвируса, аденовируса, альфа-вируса, рабдовируса и герпесвируса для получения вакцины против коронавируса MERS-CoV.

Известно решение (WO 2006071250 A2), где в качестве вакцины против SARS-CoV предложено использование векторных систем на основе поксвирусов и бакуловирусов, содержащих гены S белка SARS-CoV и его антигенных фрагментов.

Известно решение (CN 1276777 C), в котором предложена вакцина против тяжелого острого респираторного синдрома на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, содержащего последовательность S белка вируса SARS-CoV.

Филогенетические исследования позволили установить, что вирус SARS-CoV-2 более близок к коронавирусом, поражающим летучих мышей (bat-SL-CoVZC45, bat-SL-CoVZXC21), чем к коронавирусом,

циркулирующим в человеческой популяции. Так, например, S белок SARS-CoV-2 гомологичен S белку SARS-CoV не более чем на 75% (Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7). Таким образом, кандидатные вакцины против заболеваний, вызываемых SARS-CoV, не эффективны против COVID-19.

В настоящее время не зарегистрировано ни одного препарата для индукции специфического иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2. Известно, что несколько фармацевтических компаний ведут разработку кандидатных вакцин, часть из которых основана на технологии рекомбинантных аденовирусных векторов.

Фармацевтическая компания SanSino (Тяньцзинь, Китай) совместно с Пекинским институтом биотехнологии (Пекин, Китай) разработала кандидатную вакцину против COVID-19, которая включает вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа (с удаленными E1 и E3 областями), содержащий оптимизированный ген S белка коронавируса SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GenBank YP_009724390) с сигнальным пептидным геном активатора тканевого плазминогена. Вакцина представляет собой жидкую форму, содержащую 5×10^{10} вирусных частиц/0,5 мл. Данное решение было выбрано авторами заявляемого изобретения за прототип.

Существенным недостатком данного решения является то, что вакцина может быть не эффективна у некоторых групп населения за счет наличия предсуществующего иммунитета к аденовирусу человека 5 серотипа. Так, например, согласно опубликованным данным однократного введения данной кандидатной вакцины было недостаточно, чтобы вызвать высокий уровень гуморальных иммунных реакции у людей в возрасте 55 лет или старше (Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial [published online ahead of print, 2020 Jul 20]. *Lancet*. 2020; S0140-6736(20)31605-6. doi:10.1016/S0140-6736(20)31605-6). Тогда как именно люди пенсионного возраста находятся в зоне риска тяжелого течения COVID-19.

Таким образом, в области техники существует потребность в разработке фармацевтического средства, которое является безопасным и способно индуцировать иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

Осуществление изобретения

Технической задачей заявленной группы изобретений является создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного фармацевтического средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у различных групп населения за счет использования двух различных аденовирусных векторов. Кроме того, технический результат заключается в создании фармацевтического средства, обеспечивающего повышенные уровни иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Указанный технический результат достигается тем, что создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 1).

Также создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 2).

Создано также фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 3).

При этом каждое фармацевтическое средство находится в жидкой или лиофилизированной форме. Причем буферный раствор фармацевтического средства для жидкой формы содержит, мас. %:

трис	от 0,1831 до 0,3432
хлорид натрия	от 0,3313 до 0,6212
сахароза	от 3,7821 до 7,0915
магния хлорида гексагидрат	от 0,0154 до 0,0289
ЭДТА	от 0,0029 до 0,0054
полисорбат -80	от 0,0378 до 0,0709
этанол 95%	от 0,0004 до 0,0007
вода	остальное.

А буферный раствор фармацевтического средства для лиофилизированной формы содержит, мас. %:

трис	от 0,0180 до 0,0338
хлорид натрия	от 0,1044 до 0,1957
сахароза	от 5,4688 до 10,2539
магния хлорида гексагидрат	от 0,0015 до 0,0028
ЭДТА	от 0,0003 до 0,0005
полисорбат -80	от 0,0037 до 0,0070
вода	остальное.

Компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

Каждое фармацевтическое средство применяют для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, при этом используют компонент 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схема экспрессионной кассеты, где

- 1 - промотор,
- 2 - целевой ген,
- 3 - сигнал полиаденилирования.

На фиг. 2 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD4+ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации испытуемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - сформированные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);

- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

● - Данные по одному животному.

■ - Среднее геометрическое значение, рассчитанное для каждой группы.

На фиг. 3 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации мышей.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - сформированные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

● - Обозначены данные по каждому животному.

■ - Среднее геометрическое значение, рассчитанное для каждой группы.

На фиг. 4 представлена выживаемость сирийских хомячков, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, и контрольных групп на модели летальной инфекции вируса SARS-CoV-2.

Ось ординат - выживаемость животных, %.

Ось абсцисс - дни после заражения вирусом SARS-CoV-2.

● - Обозначена выживаемость сирийских хомячков, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, сформированные группы:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
 - 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
 - 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
 - 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2),
- которая во всех группах составила 100%.

◆ - Отрицательный контроль, группа:

- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2).

■ - Отрицательный контроль, группа:

- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2).

× - Отрицательный контроль, группа:

- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2).

▲ - Отрицательный контроль, группа:

- 32) фосфатно-солевой буфер.

На фиг. 5 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у приматов, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1.

Ось ординат - реципрокный титр IgG к RBD вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

● - Иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

○ - Плацебо.

На фиг. 6 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных RBD фрагментом S антигена SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации приматов.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

Черным цветом обозначена группа животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

Серым цветом обозначена группа контрольных (не вакцинированных) животных.

Среднее арифметическое значение представлено в виде пунктирной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями вакцинированных и контрольных (невакцинированных) животных обозначена скобкой и символом * ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 7 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных RBD фрагментом S антигена SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации приматов.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

Черным цветом обозначена группа животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

Серым цветом обозначена группа контрольных (невакцинированных) животных.

Среднее арифметическое значение представлено в виде пунктирной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями вакцинированных и контрольных (невакцинированных) животных обозначена скобкой и символом * ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 8 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 9 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 10 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 11 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дней обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 12 представлен прирост концентрации ИФН γ (в размах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 дни исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически

достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 13 представлен прирост концентрации ИФН γ (в размах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 дни исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 14 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1,

Ось ординат - титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

▲ - Данные по каждому добровольцу.

На фиг. 15 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1,

Ось ординат - титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

▲ - Данные по каждому добровольцу.

Реализация изобретения

Для создания безопасного и эффективного фармацевтического средства для индукции специфического иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 была выбрана векторная система на основе аденовирусов. Аденовирусные векторы обладают целым рядом преимуществ: они не способны размножаться в клетках человека, проникают как в делящиеся, так и неделящиеся клетки, способны индуцировать клеточный и гуморальный иммунные ответы, обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого антигена.

Вместе с тем клиническое применение данных векторов может быть затруднено из-за наличия у части населения предрасполагающего иммунного ответа к аденовирусам, который возникает в результате перенесенного заболевания. Результаты научных исследований показывают, что титры антител к аденовирусному вектору увеличиваются с возрастом, а также отличаются в различных популяциях. Так, например, высокие уровни серопревалентности к аденовирусу человека 5 серотипа наблюдаются у 40-45% населения в США и до 90% населения стран Африки к югу от Сахары (Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., et al. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; 11(2):351-357; Dudareva M., Andrews L., Gilbert S.C., et al. Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan children, in the context of vaccine vector efficacy. Vaccine. 2009; 27(27):3501-3504; Zhang S., Huang W., Zhou X., Zhao Q., Wang Q., Jia B. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy Chinese adults. J. Med. Virol., 2013; 85(6):1077-1084).

Нейтрализующие антитела к вектору значительно снижают специфический иммунный ответ против трансгена и могут отрицательно влиять на эффективность вакцинации.

Авторы изобретения на основании проведенных исследований определили серотипы аденовирусных векторов, которые настолько отличаются генетически, чтобы при последовательной иммунизации не влиять на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена. Для дальнейшей работы было выбрано 3 вируса - аденовирус человека 26 серотипа, аденовирус человека 5 серотипа и аденовирус обезьян 25 серотипа. Затем были отобраны вирусные клоны, отличающиеся повышенными ростовыми свойствами, и на их основании, с помощью генно-инженерных подходов, были разработаны рекомбинантные аденовирусные векторы.

Таким образом, использование комбинации нескольких типов генетических векторов позволило создать арсенал фармацевтических средств, что обеспечит преодоление трудностей, связанных с наличием предрасполагающего иммунного ответа к некоторым аденовирусам у людей, в частности к аденовирусам человека 5-го серотипа.

При этом появляется возможность использования изобретения, по которому вариант фармацевтического средства выбирается после оценки иммунного статуса пациента к серотипам аденовирусных векторов, входящих в состав средства (аденовирусу человека 26 серотипа, аденовирусу человека 5 серотипа,

аденовирусу обезьян 25 серотипа).

С помощью методов генной инженерии в рекомбинантные аденовирусные векторы вставили экспрессионные кассеты, которые включали ген вакцинного антигена и элементы регуляции экспрессии (промотор, сигнал полиаденилирования). Схема экспрессионной кассеты представлена на фиг. 1.

Для достижения максимально эффективной индукции иммунных реакций авторы разработали различные варианты экспрессионных кассет.

В качестве антигена во всех кассетах был выбран S белок (Spikeprotein) вируса SARS-CoV-2, который был оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих. S белок является одним из структурных белков коронавируса. Он экспонирован на поверхности вирусной частицы и отвечает за связывание с рецептором ангиотензин-превращающего фермента II типа (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Результаты проведенных исследований показали, что к данному белку формируются вирус-нейтрализующие антитела, благодаря чему он является перспективным антигеном для создания фармацевтического средства.

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. CMV промотор - это промотор ранних генов цитомегаловируса, который обеспечивает конститутивную экспрессию во множестве типов клеток. Однако сила экспрессии гена-мишени, управляемая промотором CMV, варьируется в зависимости от типов клеток. Кроме того, было показано, что уровень экспрессии трансгена под контролем CMV-промотора уменьшается с увеличением времени культивирования клеток из-за подавления экспрессии генов, которое связано с метилированием ДНК [Wang W., Jia Y.L., Li Y.C., Jing C.Q., Guo X., Shang X.F., Zhao C.P., Wang T.Y. Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells// Scientific Reports. - 2017. - Vol. 8. - p. 10416].

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. CAG-промотор - синтетический промотор, который включает ранний энхансер промотора CMV, промотор β -актина курицы и химерный интрон (β -актина курицы и β -глобин кролика). Экспериментально показано, что транскрипционная активность промотора CAG выше, чем у промотора CMV [Yang C.Q., Li X.Y., Li Q., Fu S.L., Li H., Guo Z.K., Lin J.T., Zhao S.T. Evaluation of three different promoters driving gene expression in developing chicken embryo by using in vivo electroporation// Genet. Mol. Res. - 2014. - Vol. 13. - p. 1270-1277].

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. Промотор EF1 - промотор человеческого эукариотического фактора элонгации трансляции 1β (EF-1 α). Промотор является конститутивно активным в широком диапазоне типов клеток [PMID: 28557288. The EF-1 α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells]. Ген EF-1 α кодирует фактор элонгации-1 α , который является одним из наиболее распространенных белков в эукариотических клетках и экспрессируется почти во всех типах клеток млекопитающих. Данный промотор EF-1 α часто активен в клетках, в которых вирусные промоторы не способны экспрессировать контролируемые гены, и в клетках, в которых вирусные промоторы постепенно заглушаются.

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 4 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Таким образом, в результате проведенной работы было разработано 3 варианта фармацевтического средства.

1. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой сред-

ство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

При этом компоненты фармацевтического средства могут находиться в разных упаковках.

Также авторами изобретения были разработаны жидкая и лиофилизированная формы фармацевтического средства.

Кроме того, авторами изобретения были подобраны варианты буферного раствора, которые позволяют хранить разработанное фармацевтическое средство как в замороженном виде при температуре ниже -18°C , так и в виде лиофилизата при температуре от 2 до 8°C .

Также был разработан способ применения фармацевтического средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, включающий использование компонента 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pAd26-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса человека 26 серотипа (два плеча гомологии), и ген устойчивости к ампициллину. Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 26-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pDC белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4 области до конца генома. Синтез конструкции pAd26-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса человека 26-го серотипа смешивали с pAd26-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pAd26-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pAd26-dlE1, несущая геном аденовируса человека 26-го серотипа с делетированной E1-областью.

Затем в полученной плазмиде pAd26-dlE1 с использованием стандартных методов клонирования была заменена последовательность, содержащая открытую рамку считывания 6 (ORF6-Ad26), на аналогичную последовательность из генома аденовируса человека 5-го серотипа для того, чтобы аденовирус человека 26-го серотипа был способен эффективно размножаться в культуре клеток HEK293. В результате была получена плазида pAd26-dlE1-ORF6-Ad5.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd26-dlE1-ORF6-Ad5 была удалена E3-область генома аденовируса (примерно 3321 п.о. между генами pVIII и U-exon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный вектор pAd26-only-null на основе генома аденовируса человека 26-го серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей. В качестве материнской последовательности human adenovirus 26-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 5.

Кроме того, авторами было разработано несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

На основе плазмидной конструкции pAd26-Ends генно-инженерным методом были получены конструкции pArms-26-CMV-S-CoV2, pArms-26-CAG-S-CoV2, pArms-26-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии генома аденовируса 26-го серотипа. После этого, конструкции pArms-26-CMV-S-CoV2, pArms-26-CAG-S-CoV2, pArms-26-EF1-S-CoV2 линейаризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd26-only-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd26-only-CMV-S-CoV2, pAd26-only-CAG-S-CoV2, pAd26-only-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей, с экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На четвертом этапе плазмиды pAd26-only-CMV-S-CoV2, pAd26-only-CAG-S-CoV2, pAd26-only-EF1-S-CoV2 гидролизвали специфическими эндонуклеазами рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293.

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма

human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 2. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 1, очищали методом анионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5:

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad26-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad26-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 1 в варианте 1 и в варианте 2 разработанного фармацевтического средства.

Пример 3. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pSim25-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса обезьян 25-го серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса обезьян 25-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность от конца E1-области до pIVa2 белка. Второе плечо гомологии содержит последовательность конца генома аденовируса, включая правый инвертированный концевой повтор. Синтез конструкции pSim25-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса обезьян 25-го серотипа смешивали с pSim25-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pSim25-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pSim25-dlE1, несущая геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pSim25-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (3921 п.о. от начала гена 12,5K до гена 14,7K) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате была получена плазмидная конструкция pSim25-null, кодирующая полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-

областей. В качестве материнской последовательности simian adenovirus 25-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 6.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 4 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Далее генно-инженерным методом на основе плазмидной конструкции pSim25-Ends были получены конструкции pArms-Sim25-CMV-S-CoV2, pArms-Sim25-CAG-S-CoV2, pArms-Sim25-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии из генома аденовируса обезьян 25-го серотипа. После этого, конструкции pArms-Sim25-CMV-S-CoV2, pArms-Sim25-CAG-S-CoV2, pArms-Sim25-EF1-S-CoV2 линейаризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pSim25-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены рекомбинантные плазмидные векторы pSim25-CMV-S-CoV2, pSim25-CAG-S-CoV2, pSim25-EF1-S-CoV2, содержащие полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-областей и экспрессионную кассету SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На третьем этапе плазмиды pSim25-CMV-S-CoV2, pSim25-CAG-S-CoV2, pSim25-EF1-S-CoV2 гидролизуют специфической эндонуклеазой рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293. Полученный материал был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантных аденовирусов.

В результате были получены рекомбинантные аденовирусы человека 25 серотипа, содержащие ген S белка вируса SARS-CoV-2: simAd25-CMV-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 4), simAd25-CAG-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 2), simAd25-EF1-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 3).

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 4. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 3, очищали методом анионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области.

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (simAd25-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (simAd25-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (simAd25-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (simAd25-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (simAd25-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 про-

мотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (simAd25-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 2 в варианте 1 разработанного фармацевтического средства и компонентом 1 в варианте 3 разработанного фармацевтического средства.

Пример 5. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pAd5-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса человека 5-го серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 5-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pIX белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4-области до конца генома. Синтез конструкции pAd5-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса человека 5-го серотипа смешивали с pAd5-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pAd5-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pAd5-dlE1, несущая геном аденовируса человека 5-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd5-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (2685 п.о. от конца гена 12,5K до начала последовательности U-эxon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный плазмидный вектор pAd5-too-null на основе генома аденовируса человека 5-го серотипа с делецией E1 и E3 областей генома. В качестве материнской последовательности human adenovirus 5-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 7.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Далее генно-инженерным методом на основе плазмидной конструкции pAd5-Ends были получены конструкции pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, pArms-Ad5-CAG-S-CoV2, pArms-Ad5-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии из генома аденовируса 5-го серотипа.

После этого, конструкции pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, pArms-Ad5-CAG-S-CoV2, pArms-Ad5-EF1-S-CoV2 лианеризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd5-too-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с делецией E1 и E3 областей и экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На четвертом этапе плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2 гидролизуют специфической эндонуклеазой рестрикции для удаления векторной части. Полученным препаратом ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293. Полученный материал был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантного аденовируса.

В результате были получены рекомбинантные аденовирусы человека 5-го серотипа, содержащие ген S белка вируса SARS-CoV-2: Ad5-CMV-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 2), Ad5-EF1-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 3).

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 6. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 5, очищали методом анионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области.

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор,

ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad5-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad5-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad5-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad5-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad5-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad5-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 1 в варианте 1 и в варианте 2 разработанного фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 2 в варианте 1 и в варианте 3 разработанного фармацевтического средства.

Пример 7. Получение буферного раствора.

Разработанное фармацевтическое средство по данному изобретению состоит из двух компонентов, находящихся в разных флаконах. При этом каждый компонент представляет собой иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса с экспрессионной кассетой в буферном растворе.

Авторами изобретения был подобран состав буферного раствора, обеспечивающий стабильность рекомбинантных аденовирусных частиц. Данный раствор включает:

- 1) трис-(гидроксиметил)аминометан (трис), который необходим для поддержания pH раствора;
- 2) хлорид натрия, который добавляют для достижения необходимой ионной силы и осмолярности;
- 3) сахарозу, которая используется в качестве криопротектора;
- 4) магния хлорида гексагидрат, который необходим в качестве источника двухвалентных катионов;
- 5) ЭДТА, который используется в качестве ингибитора свободно-радикального окисления;
- 6) полисорбат-80, который используется в качестве поверхностно-активного вещества;
- 7) этанол 95%, который применяют в качестве ингибитора свободно-радикального окисления;
- 8) воду, которая используется в качестве растворителя.

Авторами изобретения было разработано 2 варианта буферного раствора: для жидкой формы фармацевтического средства и для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Для определения концентрации веществ, входящих в состав буферного раствора для жидкой формы фармацевтического средства, было получено несколько вариантов экспериментальных групп (табл. 1). В каждый из полученных буферных растворов добавляли один из компонентов фармацевтического средства.

1. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

2. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

3. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса обезьяны 25-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав фармацевтического средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре -18 и -70°C в течение 3 месяцев, затем размораживали и оценивали изменение титра рекомбинантных аденовирусов.

Таблица 1

Состав экспериментальных буферных растворов для жидкой формы фармацевтического средства

№ групп	Состав буферного раствора							
	Трис (мг)	Хлорид	Сахароза (мг)	Магния хлорида	ЭДТА (мг)	Полисорбат -80 (мг)	Этанол 95%	Вода
		натрия (мг)		гексагидрат (мг)			(мг)	
1	0,968	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
2	1,815	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
3	1,21	1,752	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
4	1,21	3,285	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
5	1,21	2,19	20	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
6	1,21	2,19	37,5	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
7	1,21	2,19	25	0,0816	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
8	1,21	2,19	25	0,153	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
9	1,21	2,19	25	0,102	0,0152	0,25	0,0025	до 0,5 мл
10	1,21	2,19	25	0,102	0,0285	0,25	0,0025	до 0,5 мл
11	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,2	0,0025	до 0,5 мл
12	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,375	0,0025	до 0,5 мл
13	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,002	до 0,5 мл
14	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,00375	до 0,5 мл
15	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл

Результаты проведенного эксперимента показали, что титр рекомбинантных аденовирусов после их хранения в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства при температурах -18 и -70°C в течение 3 месяцев не изменялся.

Таким образом, разработанный буферный раствор для жидкой формы фармацевтического средства обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного фармацевтического средства в следующем диапазоне действующих веществ: трис от 0,1831 до 0,3432 мас.%; хлорид натрия от 0,3313 до 0,6212 мас.%; сахароза от 3,7821 до 7,0915 мас.%; магния хлорида гексагидрат от 0,0154 до 0,0289 мас.%; ЭДТА от 0,0029 до 0,0054 мас.%; полисорбат-80 от 0,0378 до 0,0709 мас.%; этанол 95% от 0,0004 до 0,0007 мас.%; растворитель - остальное.

Для определения концентрации веществ, входящих в состав буферного раствора для лиофилизированной формы фармацевтического средства, было получено несколько вариантов экспериментальных групп (табл. 2). В каждый из полученных буферных растворов добавляли один из компонентов фармацевтического средства.

1. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го сероти-

па с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

2. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

3. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса обезьяны 25-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{11} вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав фармацевтического средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре 2 и 8°C в течение 3 месяцев, затем размораживали и оценивали изменение титра рекомбинантных аденовирусов.

Таблица 2
Состав экспериментальных буферных растворов

№ группы	Состав буферного раствора						Вода
	Трис (мг)	Хлорид натрия (мг)	Сахароза (мг)	Магния хлорида гексагидрат (мг)	ЭДТА (мг)	Полисорбат-80 (мг)	
1	0,1936	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
2	0,363	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
							мл
3	0,242	1,1224	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
4	0,242	2,1045	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
5	0,242	1,403	58,8	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
6	0,242	1,403	110,25	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
7	0,242	1,403	73,5	0,01632	0,0038	0,05	до 1 мл
8	0,242	1,403	73,5	0,0306	0,0038	0,05	до 1 мл
9	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,00304	0,05	до 1 мл
10	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0057	0,05	до 1 мл
11	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,04	до 1 мл
12	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,075	до 1 мл
13	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл

Результаты проведенного эксперимента показали, что титр рекомбинантных аденовирусов после их хранения в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства при температуре 2 и 8°C в течение 3 месяцев не изменялся.

Таким образом, разработанный буферный раствор для лиофилизированной формы вакцины обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного фармацевтического средства в следующем диапазоне действующих веществ: трис от 0,0180 до 0,0338 мас.%; хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957 мас.%; сахароза от 5,4688 до 10,2539 мас.%; магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028 мас.%; ЭДТА от 0,0003 мас.% до 0,0005 мас.%; полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070 мас.%; растворитель - остальное.

Пример 8. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке гуморального иммунного ответа.

Одной из основных характеристик эффективности иммунизации является титр антител. В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гликопротеина SARS-CoV-2 через 21 день после введения фармацевтического средства лабораторным животным.

В эксперименте использовались млекопитающие - мыши линии BALB/c, самки 18 г. Все животные

были разделены на 31 группу по 5 животных, которым внутримышечно вводили компонент 1 фармацевтического средства в дозе 10^8 вирусных частиц/100 мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе 10^8 вирусных частиц/100 мкл. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу.

1) Белок (S) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре 4°C.

2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5% молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении 1 ч.

3) Методом 2-кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.

4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.

5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.

8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 3.

Таблица 3

Титр антител к белку S в сыворотке крови мышей
(среднее геометрическое значение титра антител)

№	Название группы животных	Титр антител
1	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	29407
3	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
4	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	38802
5	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
6	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2	38802

	(компонент 2)	
7	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
8	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
9	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
10	Ad26- null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2)	0
11	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	38802
12	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
13	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
14	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779

	2)	
1 5	Ad26- CAG -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S- CoV2 (компонент 2)	33779
1 6	Ad26- CAG -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S- CoV2 (компонент 2)	33779
1 7	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S- CoV2 (компонент 2)	38802
1 8	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S- CoV2 (компонент 2)	33779
1 9	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S- CoV2 (компонент 2)	33779
2 0	Ad26- null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2)	0
2 1	Ad25-CMV-S- CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S- CoV2 (компонент 2)	33779
2 2	simAd25-CMV-S- CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-	29407

	CoV2 (компонент 2)	
2 3	simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	25600
2 4	simAd25- CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2 5	simAd25- CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	29407
2 6	simAd25- CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	29407
2 7	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2 8	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
2 9	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
3 0	simAd25- null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2)	0
3 1	фосфатно-солевой буфер	0

Как видно из представленных данных, все варианты фармацевтического средства индуцируют гуморальный иммунный ответ к гликопротеину SARS-CoV-2.

Пример 9. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по сравнению с контрольным препаратом, содержащим один серотип рекомбинантного аденовируса.

Целью данного эксперимента являлось сравнение титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей после их иммунизации различными вариантами разработанного фармацевтического средства, содержащей 2 различных серотипа рекомбинантного аденовируса, с титрами антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей после их двукратной иммунизации контрольным препаратом, содержащим один серотип рекомбинантного аденовируса.

Для данного эксперимента использовали мышей линии BalB/c, 18 г, 35 шт.

Животные были иммунизированы с интервалом в 2 недели:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2), 5×10^6 в.ч.;
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2), 5×10^6 в.ч.;
- 3) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2), 5×10^6 в.ч.;
- 4) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad26-CMV-S-CoV2, 5×10^6 в.ч.;
- 5) Ad5-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2, 5×10^6 в.ч.;
- 6) simAd25-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2, 5×10^6 в.ч.;
- 7) PBS.

Титр антител к S антигену вируса SARS-CoV-2 определяли методом ИФА через 1 месяц после последней иммунизации. Результаты эксперимента представлены в таблице.

Таблица 4

Титр антител к S антигену вируса SARS-CoV-2 в крови мышей через месяц после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством и контрольными препаратами

Название группы	Титр антител
Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	3104
Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	2702
simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	3104
Ad26-CMV-S-CoV2, Ad26-CMV-S-CoV2	588
Ad5-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	512
simAd25-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	446
PBS	0

Как видно из представленных данных иммунизация животных фармацевтическим средством приводит к эффекту потенцирования иммунных реакций. Данный эффект выражается в том, что титр антител к S белку вируса SARS-Co-2 в сыворотке крови животных, иммунизированных фармацевтическим средством, содержащим два типа вектора, значительно больше, чем сумма титров антител в группах, которым вводили один тип вектора.

Пример 10. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих лимфоцитов.

Напряженность клеточного иммунитета в отношении коронавируса SARS-Cov2 оценивали по количеству пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов периферической крови лабораторных мышей в культуре *in vitro* после повторной рестимуляции клеток рекомбинантным RBD фрагментом S белка данного коронавируса. Для определения количества пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов использовали метод окраски клеток красителем CFSE. Принцип этого метода заключается в том, что флуоресцентный нетоксичный краситель CFSE способен беспрепятственно проникать в клетки. После стимуляции клеток антигеном лимфоциты начинают пролиферировать, при этом краситель, находящийся в родительской клетке, распределяется поровну между дочерними клетками. Концентрация метки, а следова-

тельно, и интенсивность флуоресценции снижаются ровно в два раза. Поэтому делящиеся клетки легко отслеживать по уменьшению их флуоресценции.

В эксперименте использовались мыши линии C57BL/6. Все животные были разделены на 31 группу (по 3 животных), которым внутримышечно вводили компонент 1 фармацевтического средства в дозе 10^8 вирусных частиц/100 мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе 10^8 вирусных частиц/100 мкл. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

На 8 день эксперимента животных усыпляли. Из селезенки выделяли лимфоциты методом центрифугирования в градиенте фиколла-урографина. Затем выделенные клетки окрашивали CFSE по методике (B.J. Quah et al., Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidylester, Nature Protocols, 2007, № 2(9), 2049-2056) и культивировали в присутствии антигена (гликопротеин S вируса SARS-CoV-2). Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены на фиг. 2, 3. Таким образом, можно заключить, что все варианты разработанного фармацевтического средства индуцируют формирование антиген-специфического иммунного ответа (как CD4+, так и CD8+).

Пример 11. Исследование протективной активности разработанного фармацевтического средства против COVID-19 на лабораторных животных.

Протективную эффективность разработанного фармацевтического средства против COVID-19 оценивали на модели летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом.

Животные были разделены на 31 группу по 8 шт/группе и иммунизированы двукратно: компонентом 1 (в дозе 10^8 вирусных частиц/животное) и компонентом 2 разработанного фармацевтического средства (в дозе 10^8 вирусных частиц/животное) с интервалом в 21 день. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);

- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

Введение иммуносупрессантов начинали на 7 сутки после бустирующей иммунизации, заражали животных вирусом SARS-CoV-2 на 14 сутки после бустирующей иммунизации интраназально в дозе 10^6 TCID₅₀ на животное, в объеме 50 мкл.

В течение эксперимента масса тела контрольных не вакцинированных животных после заражения стремительно снижалась (на 10 день масса тела животных снизилась в среднем на 32% от исходной). В то же время масса тела животных, иммунизированных всеми вариантами фармацевтического средства, в первые дни после заражения незначительно снижалась, а затем возрастала (на 10 день масса тела животных увеличилась в среднем на 11% от исходной).

На фиг. 4 представлены данные выживаемости животных после заражения. По результатам исследования было показано, что иммунизация животных всеми вариантами фармацевтического средства позволяет защитить 100% животных с индуцированным иммунодефицитом от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. В контрольной группе не вакцинированных животных наблюдается 100% летальность.

Таким образом, на модели сирийских хомяков с индуцированным иммунодефицитом было показано, что иммунизация животных разработанным фармацевтическим средством позволяет сформировать протективный иммунный ответ, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Пример 12. Исследование токсичности разработанного фармацевтического средства.

Исследование токсичности проводили на половозрелых аутбредных мышах обоего пола. Для эксперимента использовали фармацевтическое средство по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), фармацевтическое средство по варианту 2 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: simAd25-CMV-S-CoV2) фармацевтическое средство по варианту 3 (компонент 1: simAd25-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2). Каждый из компонентов фармацевтического средства вводили внутримышечно и внутривенно в возрастающих дозах: 10^8 в.ч., 10^9 в.ч., 10^{10} в.ч., 10^{11} в.ч.

На протяжении эксперимента гибели животных не зафиксировано, симптомов интоксикации не выявлено. Влияния вакцины на массу тела и массу органов животных не выявлено. Некропсия, проведенная через 14 дней после введения векторной вакцины, не показала отклонений в структуре внутренних органов мышей. Наличия местно-раздражающего действия, в рамках проведенного эксперимента, не установлено.

Таким образом, данные исследования свидетельствуют об отсутствии токсичности разработанного фармацевтического средства.

Пример 13. Исследование иммуногенности разработанного фармацевтического средства по варианту 1 на приматах.

Задача данного эксперимента заключалась в определении напряженности гуморального и клеточного иммунного ответа у приматов после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством.

Развитие гуморального иммунного ответа оценивали по увеличению титра антител к белку S вируса SARS-CoV-2 и титра вируснейтрализующих антител в крови приматов. Развитие клеточного иммунного ответа оценивали по количеству пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Для данного исследования было использовано 17 обезьян макак резусов, самцов, весом 2,0-2,2 кг. Животных вакцинировали разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2). В терапевтической дозе для человека 10^{11} вирусных частиц/дозу вводили компонент 1, затем через 21 день в терапевтической дозе для человека 10^{11} вирусных частиц/дозу вводили компонент 2.

Пробы крови отбирали у всех животных перед вакцинацией (0 день), а также через 7, 14 и 28 дней после вакцинации. Титры специфических антител к домену RBD белка S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови приматов после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством определяли методом ИФА по следующей методике:

на планшеты иммобилизовали антиген RBD вируса SARS-CoV-2 в концентрации 100 нг/лунка;

готовили двукратные разведения сыворотки крови приматов в буфере для забивки (разведения 1:50-1:51200), инкубировали в лунках планшета (стрипа) с иммобилизованным RBD-антигеном;

после промывки образовавшийся комплекс Ag-At выявляли конъюгатом, специфическим к Fc-фрагменту IgG антител обезьяны (Anti-MONKEY IgG (gamma chain) (GOAT) Antibody-617-101-012, ROCKLAND), меченным пероксидазой хрена;

после промывки к образовавшемуся комплексу добавляли хромогенный субстрат; затем ферментативную реакцию останавливали стоп-реагентом.

Развившуюся окраску (абсорбцию) регистрировали на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo) в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр - 620 нм.

Титр IgG антител к S белку вируса SARS-CoV-2 определяли как разведение сыворотки, в котором значение оптической плотности превосходит значение оптической плотности отрицательного контроля (сыворотка крови того же примата до введения препарата) в том же разведении в два раза. Результаты эксперимента представлены на фиг. 5.

Как видно из полученных данных, у всех животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, наблюдается повышение титра антител к вирусу SARS-CoV-2. При этом максимальный титр антител наблюдается через неделю после введения компонента 2 (на 28 день эксперимента).

Уровень вируснейтрализующих антител в крови макак резус определяли в реакции нейтрализации по подавлению негативных колоний, образованных вирусом SARS-CoV-2 в односуточном монослое клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. Реакцию нейтрализации ставили в варианте: постоянная доза вируса - разведения сыворотки.

В работе использовали исследуемые иммунные сыворотки, полученные от обезьян перед вакцинацией (0 день), через 7, 14 и 28 дней после вакцинации, положительный контрольный образец (сыворотку крови переболевшего человека, заведомо содержащую специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2), отрицательный контрольный образец (фетальную телячью сыворотку (ФТС), заведомо не содержащую специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2) и культуру вируса SARS-CoV-2.

В реакции нейтрализации использовали разведение 1:5 сывороток крови. Рабочее разведение вирусосодержащей суспензии на основе вируса SARS-CoV-2 ("антиген") готовили на растворе Хенкса с 2% ФТС и антибиотиками (стрептомицина сульфат и бензилпенициллина натриевая соль) по 100 ЕД/мл десятикратным шагом. В приготовленном разведении концентрация вируса SARS-CoV-2 составила 200 БОЕ мл⁻¹.

В эксперименте использовали односуточный монослой клеток Vero C1008 в пластиковых флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см² фирма "Cellstar®", отобранных для постановки реакции нейтрализации. Смесь равных объемов сыворотки и культуры вируса SARS-CoV-2 инкубировали в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C, затем вносили по 0,5 мл на монослой клеток VeroC1008, предварительно удалив ростовую среду. После адсорбции комплекса антиген+антитело на клетках в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C инокулят декантировали, затем наносили первичное агаровое покрытие, разработанное для вируса SARS-CoV-2, и проводили дальнейшее инкубирование монослоя при температуре от 36,5 до 37,5°C в течение 2 суток.

Через 2 суток инфицированный монослой клеток с целью окрашивания 0,1% раствором нейтрального красного наносили вторичное агаровое покрытие и инкубировали в течение 24 ч при температуре от 36,5 до 37,5°C, затем проводили учет негативных колоний во флаконах. За титр антител исследуемой сыворотки принимали высшее разведение сыворотки крови, в котором выявляли подавление негативных колоний, образованных вирусом SARS-CoV-2, на 50% и более по сравнению с отрицательным контролем.

Результаты эксперимента показали, что уровень вируснейтрализующих антител более 1:5 на 14 день эксперимента наблюдался у 17,6% животных, тогда как на 28 день эксперимента - у 100% животных.

Таким образом, полученные данные показывают, что введение разработанного фармацевтического средства приводит к развитию гуморального иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 у приматов.

Для оценки клеточного иммунного ответа из крови приматов перед вакцинацией (0 день), через 7, 14 и 28 дней выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности рас-

твора фикола.

Принцип метода основан на различии в плавучей плотности форменных элементов крови. Раствор полисахарида фикола в воде имеет градиент с такой плотностью, которая позволяет при центрифугировании разделить клетки периферической крови на мононуклеарную фракцию (МФ), в которую входят лимфоциты, субпопуляция моноцитов, а также бластные гемопоэтические клетки, и фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты. МФ обладают меньшей, чем фиколл, плотностью, что в результате центрифугирования определяет его расположение над слоем фикола. Плотность гранулоцитов и эритроцитов больше, чем плотность градиента, они проходят через градиент, опускаясь на дно пробирки (Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow// Scand. J. Clin. Lab. Investig. - 1968. - Vol. 21. - Suppl. 97. - p. 1-9). Тромбоциты - наименьшие клетки, остаются при правильно выбранной скорости центрифугирования в сыворотке крови, не доходя до раздела фаз "вода"/"фиколл".

После выделения мононуклеарной фракции клеток из периферической крови обезьян проводили окраску клеток флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и помещали в лунки планшета.

После высева мононуклеарных клеток в лунки планшета проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду RBD фрагментом S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 ч после добавления антигена проводили измерение % пролиферирующих клеток.

Результаты эксперимента представлены на фиг. 6, 7.

Данные, полученные в ходе эксперимента, показали, что максимальная напряженность клеточного иммунитета, вызванного иммунизацией обезьян разработанным фармацевтическим средством согласно среднему арифметическому значению процента пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов и CD8⁺ Т-лимфоцитов наблюдается на 28 день после иммунизации. Данный факт связан с проведением второй (бустирующей) иммунизацией на 21 день исследования (1,2% против 0,1% в неиммунизированной группе). В этом случае антиген-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты получают дополнительный стимул пролиферации, увеличивая долю своего присутствия в организме вакцинированного животного.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что иммунизация приматов разработанным фармацевтическим средством в исследуемой дозе и схеме иммунизации позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличимый от показателей контрольной не иммунизированной группы животных) гуморальный иммунитет, характеризующийся повышением титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2 и повышением титра вируснейтрализующих антител, а также сформировать клеточный иммунитет, представленный как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоцитами.

Пример 14. Изучение иммуногенности разработанного фармацевтического средства путем оценки клеточного иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

В рамках клинических исследований разработанного фармацевтического средства по варианту 1 было проведено исследование напряженности клеточного иммунитета.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

1) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек);

2) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

На 0 день (до введения препарата), 14 день и 28 день у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фикола. Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и высевали на лунки планшета. Затем проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 ч после добавления антигена проводили измерение % пролиферирующих клеток, а культуральную среду отбирали для измерения количества гамма-интерферона.

Для определения % пролиферирующих клеток проводили их окрашивание антителами против маркерных молекул Т-лимфоцитов CD3, CD4, CD8 (anti-CD3 Pe-Cy7 (BDBiosciences, клон SK7), anti-CD4 APC (BDBiosciences, клон SK3), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (BDBiosciences, клон SK1)). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS AriaIII (BDBiosciences, США). Результирующий процент пролиферирующих клеток в каждом образце определяли путем вычитания результата, полученного при анализе интактных клеток их результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса. Полученные результаты представлены на фиг. 8, 9 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 10, 11 (для лиофилизированной формы вакцины).

Количественное определение концентрации гамма-интерферона (ИФН γ) в культуральной среде мононуклеарных клеток крови человека через 72 ч после рестимуляции их S белком коронавируса проводили с помощью набора "гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ" (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) по инструкции производителя. Полученные данные представлены на фиг. 12 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 13 (для лиофилизированной формы вакцины).

Результаты проведенного исследования показали, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами фармацевтического средства по варианту 1, согласно медиане значений пролиферирующих CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов, отмечается с увеличением дней после иммунизации. В обеих группах максимальные значения, пролиферирующих как CD4 $^{+}$, так и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов наблюдаются на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днями исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях, пролиферирующих CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов - $p < 0,001$.

Из результатов, представленных на фиг. 12, 13, можно заключить, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами фармацевтического средства по варианту 1, согласно медиане прироста концентрации ИФН γ отмечается с увеличением дней после иммунизации. Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ до иммунизации (0 день) и через 14 дней после проведенной вакцинации составила $p < 0,001$. Максимальный прирост концентрации ИФН γ наблюдается на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днями исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ - $p < 0,001$.

Таким образом, исходя из приведенных данных можно заключить, что иммунизация разработанным фармацевтическим средством способна вызвать формирование напряженного антиген-специфического клеточного звена противoinфекционного иммунитета, что подтверждается высокой степенью статистической достоверности в измеряемых параметрах до и после иммунизации.

Пример 15. Изучение иммуногенности разработанного фармацевтического средства путем оценки титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

1) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек);

2) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

На 14, 21, 28 дни у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли сыворотку.

Титр антител к домену RBDS белка вируса SARS-CoV-2 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора "SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи". Анализ проводили согласно инструкции производителя.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев после введения жидкой формы препарата представлены на фиг. 14.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотки крови добровольцев после введения лиофилизированной формы препарата представлены на фиг. 15.

Как видно из представленных данных, иммунизация добровольцев разработанным фармацевтическим средством как в жидкой форме, так и в лиофилизированной форме позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличимый от показателей контрольной не иммунизированной группы животных) гуморальный иммунитет, характеризующийся повышением титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2. При этом рост напряженности гуморального иммунного ответа отмечается с увеличением дней после иммунизации.

Таким образом, поставленная техническая задача, а именно создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, достигнута, что подтверждается приведенными примерами.

Промышленная применимость

Все приведенные примеры подтверждают эффективность фармацевтических средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и промышленную применимость.

Перечень последовательностей

<110> федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<120> Фармацевтическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты).

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 4711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CMV-промотор, оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

<400> 1

atagtaatca attacggggt cattagtta tagccatat atggagtcc gcgtacata 60
acttacgga aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 120
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga 180
gtatttacgg taaactgccc acttgccagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 240
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagt acatgacctt 300
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattatgc atcgctatta ccatggtgat 360
gcgggtttgg cagtacatca atggcgctgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 420
tcctccccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc 480
aaaatgtctg aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 540
ggctctatata agcagagctg gtttagtga cctgagatc cgtagagat ctgttaccgt 600
cgacggggcc gctcagcct aagcttgga ccatgttgt gttccttggt ttattgccac 660
tagtctctag tcagtgtgtg aacctgacca caagaaccca cgtgcctcca gcctacacca 720
acagctttac cagaggcgtg tactaccccg acaaggtgtt cagatccagg gtgctgact 780
ctaccacgga cctgttctg cctttctca gcaacgtgac ctggttccac gccatccacg 840
tgtccggcac caatggcacc aagagattcg acaacccgt gctgccttc aacgacgggg 900
tgtactttgc cagcaccgag aagtccaaca tcatcagagg ctggatcttc ggcaccacac 960
tggacagcaa gaccagagc ctgctgatcg tgaacaacgc caccaacgtg gtcacaaag 1020
tgtgcgagtt ccagttctgc aacgacccct tcctgggctg ctactatcac aagaacaaca 1080
agagctggat ggaaagcgag ttccgggtgt acagcagcg caacaactgc acctcgagt 1140
acgtgtccca gcctttcctg atggacttgg aaggcaagca gggcaacttc aagaacctgc 1200
gcgagttcgt gttcaagaac atcgacggct actcaagat ctacagcaag cacaccctca 1260
tcaacctcgt cggggatctg cctcagggtc tctctgtctt ggaacccctg gtggtatctg 1320
ccatcgcat caacatcacc cggtttcaga cactgctggc cctgcacaga agctacttga 1380
cacctggcga tagcagcagc ggaatggacag ctggtgccgc cgttactat gtgggtacc 1440
tgcagcctag aaccttctg ctgaagtaca acgagaacgg caccatcacc gacgccgtgg 1500
attgtctct ggatctctg agcagagcaa agtgcacctt gaagtcttc accgtggaaa 1560
agggcatcta ccagaccagc aacttcggg tgacgccac cgaatccatc gtgcggttcc 1620
ccaatatcac caatctgtc cccttcggcg aggtgttcaa tgccaccaga ttgcctctg 1680
tgtacgctg gaaccggaag cggatcagca atgctgtggc cgactactcc gtgctgtaca 1740
actccgccag cttcagcacc tcaagtgtc acggcgtgtc cctaccaag ctgaacgacc 1800
tgtcttcac aaactgttac gccgacagct tctgtatcc gggagatgaa gtgcggcaga 1860
ttgcccttg acagacagc aagatcgcc actacaacta caagctgccc gacgacttca 1920
ccggctgtgt gattgcttgg aacagcaaca acctggactc caaagtcggc ggcaactaca 1980
attacctgta ccggctgttc cggaagtcca atctgaagcc ctctgagcgg gacatctcca 2040

ccgagatcta tcaggccggc agcaccctt gtaacggcgt ggaaggcttc aactgtact 2100
 tccactgca gtctacggc tttagccca caaatggcgt gggctatcag ccctacagag 2160
 tgggtgtgt gagcttgaa ctgtgcatg cccctgccac agtgtgcggc cctaagaaaa 2220
 gcaccaatct cgtgaagaac aaatgcgtga acttcaact caacggcctg accggcaccg 2280
 gcgtgtgac agagagcaac aagaagtcc tgccattcca gcagtttggc cgggatattg 2340
 ccgataccac agacggcgtg cgagatccc agacactgga aatcctggac atcacccctt 2400
 gcagcttcgg cggagtgtct gtgatccac ctggcaccac caccagcaat caggtggcag 2460
 tgctgtacca ggacgtgaac tgtaccgaag tgccgtggc cattcacgc gatcagctga 2520
 caactacatg gcgggtgtac tccacgggca gcaatgtgt teagaccaga gccggctgtc 2580
 tgatcggagc cgagcacgtg aacaatagct acgagtgcga catcccatc ggctgtggca 2640
 tctgtccag ctaccagaca cagacaaca gccccagacg gccagatct gtggccagcc 2700
 agagcatcat tgctacaca atgtctctgg gcgccgagaa cagcgtggc tactccaaca 2760
 actctatgc tatccacc aacttacc taccgtgac cacagatc ctgctgtgt 2820
 catgaccac gaccagcgtg gactgcacca tgtacatct cgccgattcc accagtgct 2880
 ccaactgct gctgcatag ggcagcttct gacccagct gaataagacc ctgacaggga 2940
 agacatcat acagacaag aacacccaag aggtgttcg ccaagtgaag cagatctaca 3000
 agaccctcc tatcaaggac ttggcgggt tcaatttcag ccagatctg ccgactcta 3060
 gcaagccag caagcggagc ttcatcgagg acctgtgtt caacaaagt acactggccg 3120
 acgcccgtt catcaagcag tatggcgatt gtctggcgca cattgcccg agggatctga 3180
 ttgtgccca gaagttaac ggactgacag tgctgccacc actgctgacc gatgagatga 3240
 tggccagta cacatctgcc ctgtggccg gcacaatcac aagcggctgg acatttggag 3300
 ctggcggcg ctgtcagatc cctttgcta tgcagatggc ctaccggtt aacggcatcg 3360
 gagtaccac gaagtgtctg tacgagaacc agaagtgat cgccaaccag ttcaacagcg 3420
 cagcggcaa gatccaggac agcctgagca gcacagcaag cgccctggga aagctgcagg 3480
 acgtggcaa ccagaatgcc caggcactga acacctggg caagcagctg tcctccaact 3540
 tcggcggcat cagctctgtg ctgaacgaca tcctgagcag actggacaag gtggaagccg 3600
 aggtgcagat cgacagactg atcacgggaa ggtgtcagtc ctgtcagacc tacgttacc 3660
 agcagctgat cagagccgcc gagattagag cctctgcaa tctggccgc accaagatgt 3720
 ctgagtgtgt cgtgggccag agcaagagag tggactttt gcgcaagggc taccactga 3780
 tgagctccc tcagtctgcc cctcacggcg tgggtttct gcacgtgaca tacgtgcccg 3840
 ctcaagagaa gaatttcacc accgtccag ccatctgcca cgacggcaaa gccacttc 3900
 ctagaagg cgtgttcgtg tccaacggca ccattggtt cgtgaccag cggaactct 3960
 acgagccca gatcatcacc accgacaaca cctctgtg tggaactgc gacgtctga 4020
 tcggcattgt gaacaatacc gtgtacgacc ctctgcagcc cgagctggac agctcaaa 4080
 aggaactgga taagtacttt aagaaccaca caagcccgga cgtggacctg ggcgacatca 4140
 ccggaatcaa tgccagcgtc gtgaacatcc agaaagagat cgaccggctg aacgaggtgg 4200
 ccaagaatct gaacgagagc ctgatcgacc tgcaagaact ggggaagtac gagcagtaca 4260
 tcaagtggcc ctggtacatc tggctgggct ttatgcccg actgattgcc atcgtgatgg 4320
 tcacaatcat gctgtgtgc atgaccagct gctgtagct cctgaagggc tgtgttagct 4380
 gtggcagctg ctgcaagttc gacgaggacg attctgagcc cgtgctcaa ggagtcaaat 4440
 tacattacac ataagatata cgatccacc gatctagata actgatcata atcagccata 4500
 ccacattgt agaggtttta ctgtttta aaaacctccc acacctccc ctgaacctga 4560
 aacataaat gaatgcaatt gttgtttta actgtttat tgcagcttat aatgggtaca 4620
 aataagcaa tagcatcaca aatttcaca ataaagcatt ttttactg cattctagt 4680
 gtgtttgtc caaactcatc aatgtatctt a 4711
 <210> 2
 <211> 5984
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CAG-промотор,
 оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

<400> 2

gacattgatt atgactagtt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gticcatagcc 60
 catatatgga gticcgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgectgge tgaccgccc 120
 acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgtcc catagtaacg ccaataggga 180
 ctitccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagttacatc 240
 aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300
 ggcatatgc ccagttacatg acctatggg accttctac ttggcagtac atctacgtat 360
 tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttact ctccccatct 420
 cccccctcc ccccccaat ttigtatita tttatlttt aattatlttg tgcagcgtatg 480
 gggggggggg gggggggcgc gcgcagggcg gggcgggggcg gggcgagggg cggggcgggg 540
 cgaggcgag aggtgcggcg gcagccaatc agagcgggcg gctccgaaag ttctcttta 600
 tggcgaggcg cggcgggcg cgccctata aaaagcgaag cgcgcggcg gcgggagtcg 660
 ctgcgcgtg ccttcgcccc gtgccccgt cgcgcggcg cgcgcggcg cgcgcggcg 720
 tctgactgac cgcgttactc ccacaggtga gcggggcgga cgcccttct cctccgggt 780
 gtaattagc ctgggttaa tgacggctg ttctttct gtggctgctg gaaagcctg 840
 agggcctccg ggaggccct ttgtcgggg ggagcggctc ggggggtcg tgcgtgtgtg 900
 tctgctggg ggagcggcg tgcggctcg cgtgcccgg cggctgtgag cgtgcccgc 960
 gcggcgggg gctttgtcg cctccagtg tgcgcaggg gagcgggccc gggggcggtg 1020
 cccgcgggtg cgggggggct gcgaggggaa caaaggctg gtgcggggtg tgtcgtgtg 1080
 gggtgagcag ggggtgtgg cgctcgggtc gggctgcaac cccccgtga cccccctcc 1140
 cgagttctg agcacggccc ggctcgggt gcggggctcc gtacggggcg tggcggggg 1200
 ctgcgcgtc cggcggggg gtgcggcg gcgggggtgc cggcggggg gggggcctc 1260
 cggggcgggg agggcctggg ggaggggcg gcgcggcccc ggagcggcg cggctgtcga 1320
 ggcgcgcg cccgcagcca ttgctttta tggtaactg gcgagaggcg gcagggaact 1380
 cctttgtccc aaatctgtg ggagcgaaa tctgggagc gccgcgcac cccctctagc 1440
 gggcgcggg cgaagcgtg cgcgcgcg aggaaggaaa tggcggggga gggccttctg 1500
 gctgcgttc ggcgcgtcc ccttctcct ctccagctc ggggtgtg gcggggggac 1560
 gctgccttc ggggggacgg gcgagggcg ggttcgctt ctgcgtgtg accgcggtc 1620
 ctgaaagct tggtaactg ttgtgttc ttgttatt gccactagc tctagtcagt 1680
 gtgtgaacct gaccacaaga accagctgc ctccagcta caccaacagc ttaccagag 1740
 gctgtacta cccgcagaag gtgttcagat ccagcgtgt gactctacc caggacctg 1800
 tctgctctt cttagcaac gtgacctgt tccagccat ccagtgctc ggcaccaatg 1860
 gcaccaagag attcgacaac cccgtgtgc cctcaacga cggggtgtac ttgccaaga 1920
 ccgagaagtc caacatcatc agaggtgga tcttcggcac cacactggac agcaagaccc 1980
 agagcctgt gatcgtgaac aacgccacca acgtggtcat caaagtgtg gattccagt 2040
 tctgcaacga ccccttctg ggcgtctat atcacaagaa caacaagagc tggatggaaa 2100
 gcgagttcc ggtgtacagc agcgccaaca actgcacct caggtacgtg tccagcctt 2160
 tctgtgga cctggaagg aagcagggca actcaagaa cctgcggag ttcgtgtca 2220
 agaacatcga cggctactc aagatctaca gcaagcac ccctatcaac ctggtcggg 2280
 atctgcctca gggcttctt gctctggaac cctggtgga tctgcccac gcatcaaca 2340
 tcaccgggt tcagacactg ctggccctg acagaagcta cctgacacct ggcgatagca 2400
 gcagcgatg gacagctgt gccgccgtt actatgtgg ctacctgag cctagaacct 2460
 tctgtgaa gtacaacgag aacggcaca tcaccgacg cgtggattg gctgtgac 2520
 cctgagcga gacaaagtgc accctgaagt cttcaccgt ggaaaaggc atctaccaga 2580
 ccagcaact cgggtgcag cccaccgaat ccatcgtgc gttcccaat atcacaatc 2640
 tgtccccct cggcgagggt tcaatgcca ccagattgc ctctgtgac gcctggaac 2700
 ggaagcggt cagcaattg gtggcgact actccgtgt gtacaactc gccagctca 2760
 gcacctcaa gtgtacggc gtgtcccta ccaagtgaa cgacctgtc ttacaaaacg 2820
 tgtacccga cagctcgtg atccggggag atgaagtgc gcagattgc cctggacaga 2880
 caggcaagt cgccgactac aactacaag tccccacga cttaccggc tgtgtgattg 2940
 cctggaacag caacaactg gactcacaag tcggcgga ctacaattac ctgtaccgc 3000
 tgtccgga gtccaactg aagccctcg agcgggacat ctcaccgag atctatcagg 3060

ccggcagcac cccctgtaac ggctggaag gcttcaactg ctacttccca ctgcagtcct 3120
 acggctttca gccacaaat ggctggggct atcagcccta cagagtgggt gtgctgagct 3180
 tcgaactgct gcatgcccct gccacagtgt gcggccctaa gaaaagcacc aatctgtga 3240
 agaacaatg cgtgaacttc aacttcaacg gcctgaccgg caccggcgtg ctgacagaga 3300
 gcaacaagaa gtctctgcca ttccagcagt ttggccggga tattgccgat accacagacg 3360
 ccgtacgaga tcccagaga ctggaaatcc tggacatcac ccttgccagc ttccggcgag 3420
 tgtctgtgat caccctggc accaacacca gcaatcaggt ggcatgtgtg taccaggacg 3480
 tgaactgtac cgaagtggcc gtggccattc acgccgatca cctgacacct acatggcggg 3540
 tgaactccac cggcagcaat gtgtttcaga ccagagccgg ctgtctgacg ggagccgagc 3600
 acgtgaacaa tagctacgag tgcgacatcc ccatcgccgc tggcatctgt gccagctacc 3660
 agacacagac aaacagcccc agacgggcca gatctgtggc cagccagagc atcattgcct 3720
 acacaatgtc tctggcgccc gagaacagcg tggcctactc caacaactct atcgtatcc 3780
 ccaccaactt caccatcagc gtgaccacag agatcctgcc tgtgtccatg accaagacca 3840
 gcgtggactg caccatgtac atctgcggcg attccaccga gtgtccaac ctgctgtcgc 3900
 agtacggcag ctctgcacc cagctgaata gagccctgac agggatgcc gtggaacagg 3960
 acaagaacac ccaagagggt ttgcccaag tgaagcagat ctacaagacc cctctatca 4020
 aggacttcgg cggcttcaat ttacgacaga ttctgccga tctagcaag ccagcaagc 4080
 ggagcttcat cgaggacctg ctgttcaaca aagtgcact ggccgacgcc ggcttcatca 4140
 agcagtattg cgattgtctg ggccacattg ccgcccagga tctgattgc gcccaagat 4200
 ttaacggact gacagtgtct ccaccactg tgaccgatga gatgatgcc cagtacacat 4260
 ctgccctgt ggccggcaca atcacaagcg gctggacatt tggagctggc gccctctgc 4320
 agatccctct tgctatgcag atggcctacc ggttcaacgg catcggagtg acccagaatg 4380
 tctgtacga gaaccagaag ctgatccca accagttcaa cagccccatc ggcaagatcc 4440
 aggacagcct gagcagaca gcaagcggcc tgggaaagct gcaggacgtg gtcaaccaga 4500
 atgcccagcg actgaacacc ctgtcaagc agctgtcttc caacttcggc gccatcagct 4560
 ctgtgtgtaa cgacatcctg agcagactgg acaaggtgga agccgaggtg cagatcgaca 4620
 gactgatcac cggagggctg cagtcctctg agacctagt taccacagc ctgatcagag 4680
 ccgcccagat tagagcctct gccaatctgg ccgccaccaa gatgtctgag tgtgtctgg 4740
 gccagagcaa gagatggac ttttgggca agggctacca cctgatgagc ttccctcagt 4800
 ctgcccctca cggcgtggtg ttctgcacg tgacatactg gcccgctcaa gagaagaatt 4860
 tcaccaccgc tccagccatc tgccacgacg gcaaagccca ctctctaga gaagcgctgt 4920
 tctgttcaaa cggcacccat tggttctgta ccagcggaa ctctacgag cccagatca 4980
 tcaccaccga caacaccttc gtgtctggca actgcgacgt cgtgatggc attgtgaaca 5040
 ataccgtgta cgaccctctg cagcccagcg tggacagctt caaagaggaa ctggataagt 5100
 actttaagaa ccacacaagc cccgacgtgg acctgggcca catcagcggg atcaatgcca 5160
 gcgtctgtaa catccagaaa gagatcgacc ggctgaacga ggtggccaag aatctgaacg 5220
 agagcctgat cgacctgcaa gaactgggga agtacgagca gtacatcaag tggccctggt 5280
 acatctggct gggtcttctc gccgactga ttgccatcgt gatggtcaca atcatgctgt 5340
 gttgcatgac cagctgtctg agctgcctga agggctgttg tagctgtggc agctgtgca 5400
 agttcgacga ggacgattct gagcccgtgc tcaaaggagt caaattacat tacacataat 5460
 tcactctcca ggtgcaggct gcctatcaga agtggtggc tgggtggcc aatgccctgg 5520
 ctcaacaata cactgagat cttttccct ctgcaaaaa ttatggggac atcatgaagc 5580
 cccttgagca tctgacttct ggctaataaa ggaatttat ttcatgca atagtgtgt 5640
 ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttaaacatc 5700
 agaatgagta ttggtttag agtttggcaa catatgcca tatgtggct gccatgaaca 5760
 aagggtggct ataaagaggt catcagtata tgaacagcc cctgctgtc cattcttat 5820
 tccatagaaa agccttgact tgaggttaga ttttttata tttgtttg tgtattttt 5880
 tcttaacat ccctaaaatt ttcttacct gttttactag ccagatttt cctcctctcc 5940
 tgactactcc cagtcatagc tgtccctctt ctctatgga gac 5984
 <210> 3
 <211> 5314
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая EF1-промотор, оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

<400> 3

```

ggtgaggctc cggcgccgt cagtggcgag agcgacatc gccacagtc ccgagaagt 60
tggggggagg ggtcgccaat tgaaccgggt cctagagaag gtggcgcggg gtaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgcttt ttcccgaggg tggggagaga ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgcggtgaac gttcttttc gcaacgggtt tggcgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttccgc gggcctggcc tcttacggg ttatggcct tgcgtgctt 300
gaattacttc cactggctg cagtacgtga tcttgatcc cgagcttcgg gttggaagt 360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccttc gcctcgtgt tgaattgagg 420
cctggcctgg gcgtggggc cggcgctgc gaatctggg gcaccttcgc gcctgtctc 480
ctgcttcga taagtctcta gccatttaa atttttgat acctgctgc acgcttttt 540
tctgcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatctgca cactgggtt tcggttttg 600
ggggcgcggg cggcgacggg gccgtgctgt ccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcgacggg gtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgcctggctc cgcgccccc gtatcgccc cggcctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagtgc gtgagcgga agatggcgcc ttccggccc tgcgcaggg agctcaaaat 840
ggaggagag gcgctcgga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900
ttcgtctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta cggcgcccg tccaggcacc 960
tcgattagt ctgagcttt tggagtacgt cgtcttagg ttggggggag ggtttttat 1020
cgatggagt tccccacat gattgggtgg agactgaagt taggccagt tggcactga 1080
tgaattctc ctggaaatt gcccttttg agttggatc ttggtcatt ctaagcctc 1140
agacagtgt tcaaagttt ttcttccat ttcaggtgtc gtgaggaatt agcttggtac 1200
taatacgtac cacaagctt gtacatgtt tgtgttcct gtgtattgc cactagtctc 1260
tagtcagtgt gtgaacctga ccacaagaac ccagctgct ccagctaca ccaacagct 1320
taccagagcg gtgtactacc ccgacaaggt gttcagatcc agcgtgtgc actctacca 1380
ggactgttc ctgctttct tcagcaactg gactgtgtc cagccatcc acgtgtccg 1440
cacaatggc accaagagt tcgacaacc cgtctgccc ttcaacgac ggtgtgact 1500
tgccagcacc gagaagtcca acatcatcag aggtggagt ttggcaccac cactggacag 1560
caagaccag agcctgctga tctgaacaa cgccaccaac ttggtcatca aagtgtcga 1620
gttccagttc tgcaacgacc ccttctggg cgtctactat cacaagaaca acaagagctg 1680
gatggaaagc gattccggg tttacagcag cgccaacaac tgcacctcg agtacgtgtc 1740
ccagctttc ctgatggacc tggaaaggcaa gcaggggcaac ttcaagaacc tgcgcgagt 1800
cgtgttcaag aacatcgacg gctacttcaa gatctacagc aagcacacc ctatcaact 1860
cgtcggggat ctgctcagg gcttctctg tctggaacc ctggtggatc tgccatcgg 1920
catcaacatc acccggttc agacactgt ggccctgcac agaagctacc tgacacctg 1980
cgatagcagc agcggatgga cagctgggtc gcgcgcttac tatgtgggt acctgcagc 2040
tagaaccttc ctgctgaagt acaacgagaa cggcacatc accgacggc tggattgtc 2100
tctggatctc ctgagcgaga caaagtgcac cctgaagtcc ttcacgtgg aaaaggcat 2160
ctaccagacc agcaacttc ggtgcagcc caccgaatcc atcgtgcgt tcccaatat 2220
cacaatctg tgcctctcg gcgaggtgt caatgccacc agattgcct ctgtgtacg 2280
ctggaaccgg aagcgatca gcaattgct ggccgactac tccgtgtgt acaactcgc 2340
cagcttcagc acctcaagt gctacggcgt gtccctacc aagctgaac acctgtgct 2400
cacaacgtg tacccgaca gcttcgtgat cgggggagat gaagtgcggc agattgccc 2460
tggacagaca gcaagatcg ccgactaca ctacaagctg cccgacgact tcacggctg 2520
tgtgattgct tggaaacgca acaacctgga ctccaaagtc ggcggaact acaattact 2580
gtaccggctg ttccggaagt ccaatctgaa gcccttcgag cgggacatct ccaccgagat 2640
ctacaggcc gccagcacc cttgtaacgg cgtggaaggc ttcaactgct acttccact 2700
gcagctctac ggctttcag ccacaatgg cgtgggctat cagccctaca gattggtgt 2760
ctgagcttc gaactgtgc atgcccctg cacagtgtc ggcctaaga aaagcacc 2820

```

tctctgaag aacaaatgcg tgaacttcaa cttcaacggc ctgaccggca ccggcgtgct 2880
 gacagagagc aacaagaagt tcttccatt ccagcagttt ggccgggata ttgccgatac 2940
 cacagacgcc gtacgagatc ccagacact ggaatcctg gacatcacc ctgacagctt 3000
 cggcggagtg tctgtatca cccctggcac caacaccagc aatcaggtgg cagtgtgta 3060
 ccaggacgtg aactgtaccg aagtcccgt ggccattcac gccgatcagc tgacacctac 3120
 atggcgggtg tactccaccg gcagcaatgt gtttcagacc agagccggct gtctgatcgg 3180
 agccgagcac gtgaacaata gctacgagtg cgacatcccc atcggcgctg gcatctgtgc 3240
 cagctaccag acacagacaa acagcccccag acggggcaga tctgtggcca gccagagcat 3300
 cattgcttac acaatgtctc tggcgccga gaacagcgtg gcctactcca acaactctat 3360
 cgctatcccc accaacttca ccatcagcgt gaccacagag atcctgcctg tgtccatgac 3420
 caagaccagc gtggactgca ccatgtacat ctgcggcgtg tccaccgagt gctccaacct 3480
 gctgtgcag tacggcagct tctgaccca gctgaataga gccctgacag ggatgccgt 3540
 ggaacaggac aagaacaccc aagaggtgtt cgcccaagtg aagcagatct acaagacccc 3600
 tctatcaag gacttcggcg gcttcaatt cagccagatt ctgcccgtc ctagaagcc 3660
 cagcaagcgg agcttcatcg aggacctgt gttcaacaaa gtgacactgg ccgacgccgg 3720
 ctctcaag cagtatggcg attgtctgg cgacattgcc gccaggatc tgatttgcg 3780
 ccagaaagtt aacggactga cagtgtgccc accactgtg accgatgaga tgatgccca 3840
 gtacacatct gccctgtcg ccggcacaa cacaagcggc tggacattg gagctggcgc 3900
 cgctctgag atcccccttg ctatgcagat ggctaccgg ttaacggca tggagtgac 3960
 ccagatgtg ctgtacgaga accagaagct gatcgccaac cagttaaca gcgccatcg 4020
 caagatccag gacagcctga gcagcacagc aagcgccctg ggaaagctgc aggacgtggt 4080
 caaccagaat gccaggcac tgaacacct ggtaagcag ctgtctcca acttcggcgc 4140
 catcagctct gtgtgaacg acatctctgag cagactggac aaggtggaag ccgaggtgca 4200
 gatcgacaga cgtatcaccg gaaggctgca gtccctgcag acctacgta cccagcagct 4260
 gatcagagcc gccagatta gagcctctgc caatctggcc gccaccaaga tgtctgagt 4320
 tgtgtggcg cagagcaaga gagtggactt ttgcggcaag ggctaccacc tgatgagctt 4380
 cccctagct gccctcacg gcgtggtgt tctgcacgt acatactgc ccgtcaaga 4440
 gaagaatttc accacgctc cagccatctg ccacgacggc aaagccact ttctagaga 4500
 aggcgtgttc gtgtcaacg gcacccattg gtctgtgacc cagcggaaat tctacgagcc 4560
 ccagatcatc accaccgaca acacttctg gtctggcaac tgcgacgtc tgatcgcat 4620
 tgtgaacaat accgtgtacg accctctgca gcccgagctg gacagttca aagaggaact 4680
 ggataagttac tttaagaacc acacaagccc gcacgtggac ctggcgaca tcagcgaat 4740
 caatgccagc gtcgtgaaca tccagaaaga gatcgaccgg ctgaacgagg tggccaagaa 4800
 tctgaacgag agcctgatcg acctgcaaga actggggaag tacgagcagt acatcaagt 4860
 gccctggtag atctggctgg gctttatgc cggactgatt gccatctga tggtcacaat 4920
 catgtgtgt tgcatgacca gctgctgtg ctgcctgaag ggctgttga gctgtggcag 4980
 ctgtctcaag ttgacgagg acgattctga gccctgtctc aaaggagtca aattacatta 5040
 cacataagt ctgagctcg ggccggccgc cgctcgtga tcagcctga ctgtgccttc 5100
 tagttgccag caatctgtt ttggccctc ccccgctcct tcttgacc tggaaggtgc 5160
 cactccact gtccttctc aataaaatga ggaattgca tcgcattgc tgagtgggtg 5220
 tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa 5280
 tagcagcat gctggggatc cgagtgtcga taag 5314
 <210> 4
 <211> 4678
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CMV-промотор,
 оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования
 <400> 4
 atagtaatca attacggggt cattagtca tagccatat atggagtcc gcgttacata 60
 acttacggta atggcccgct ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat 120

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttgc cattgacgtc aatgggtgga 180
 gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc 240
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatcccatg acatgacctt 300
 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat 360
 gcgggtttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcgggtt gactcacggg gatttcaag 420
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc 480
 aaaatgtct aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 540
 ggtctatata agcagagctg gtttagtgaa ccgtcagatc cgctagagat ctggtacctt 600
 gtttgtgtc ctgtgttat tgcactagt ctctagttag tgtgtgaacc tgaccacaag 660
 aaccagctg cctccagcct acaccaacag cttaccaga ggcgtgtact accccgacaa 720
 ggtgttcaga tccagcgtgc tgcacttac ccaggacctg ttctgacctt tcttcagcaa 780
 cgtgacctgg tccacgcca tccagtggtc cggcaccaat ggcaccaaga gattcgacaa 840
 cccctgtctg ccttcaacg acgggggtga ctttccagc accgagaagt ccaacatcat 900
 cagagggctg atcttcggca ccacttggc cagcaagacc cagagcctgc tgatcgtgaa 960
 caacgccacc aacttgggtc tcaaagtgtg caggttccag ttctgcaacg accccttct 1020
 gggcgtctga taccacaaga acaacaagag ctggatggaa agcaggttcc ggggtgtacg 1080
 cagtgccaac aactgacctt caggtacgt gtccagcctt ttctgtatgg acctggaagg 1140
 caagcagggc aacttcaaga acctgcgcga gttcgtgtc aagaacatcg acggctactt 1200
 caagatctac agcaagcaca cccctatcaa cctcgtgccc gatctgccc agggcttctc 1260
 tgccttgcaa cccctgtgtg atctgcccat cggcatcaac atcacccgtt ttacagacat 1320
 gctggccctg cacagaagct acctgacacc tggcgatagc agcagcggat ggcagctgg 1380
 tgccgcctgt tactatgtgg gctacctgca gcctagaacc ttctgtctga agtacaacga 1440
 gaacggcacc atcacgacg cgttggatg tgcttggat cctctgagcg agacaagtgt 1500
 caacctgaag tccctaccg tggaaaagg catctaccg accagcaact tccgggtgca 1560
 gcccaccgaa tccatcgtgc ggttcccaa tatccaat ctgtcccct tcggcgaggt 1620
 gttcaatgcc accagattcg cctctgtgta cgcctggaac cggaaaggga tcagcaattg 1680
 cgtggccagc tactccgtgc tgtacaatc cgccagcttc agcaccttca agtctacgg 1740
 cgtgtccctt accaagctga acgacctgtg ctccacaac gtgtacgccc acagcttctg 1800
 gatccgggga gatgaagtgc ggcagattgc cctgggacag acaggcaaga tggccgacta 1860
 caactcaaga ctgcccagc acttcaccgg ctgtgtgatt gcttggaaac gcaacaacct 1920
 ggactccaaa gtccggcgca actacaatta cctgtaccgg ctgttccgga agtccaatct 1980
 gaagcccttc gagcgggaca tctccaccga gatctatcag gccgcagca cccctgttaa 2040
 cggcgtggaa ggccttcaact gctacttccc actgcagtc tacggcttc agccacaaa 2100
 tggcgtgggc tatcagccct acagagtgtg ggtgtctgagc ttgaaactgc tgcagcccc 2160
 tgccacagtg tggcgcccta agaaaagcac caatctctg aagaacaaat gcgtgaactt 2220
 caacttcaac ggcctgaccg gcaccggcgt gctgacagag agcaacaaga agttcctgcc 2280
 attccagcag ttggccggg atattgccga taccacagac gccgtacgag atccccagac 2340
 actggaatc ctggacatca ccccttgacg cttcggcgga gtgtctgtga taccctggg 2400
 caccacacac agcaatcagg tggcagtgct taccaggac gtgaactgta ccgaagtgcc 2460
 cgtggccatt cacccgacg agctgacacc tacatggcgg gtgtactcca ccggcagcaa 2520
 tgtgttcag accagagccg gctgtctgat cggagccgag cacgtgaaca atagctacga 2580
 gtgcgacatc cccatcgccg ctggcatctg tgccagctac cagacacaga caaacagccc 2640
 cagacgggcc agatctgtgg ccagccagag catcattgcc tacacaatgt ctctggggc 2700
 cgagaacagc gtggcctact ccaacaacte tatcgtatc cccaccaact tcaccatcag 2760
 cgtgaccaca gagatcctgc ctgtgtccat gaccaagacc agcgtggact gcacctgta 2820
 catctcgccg gattccaccg agtctccaa cctgtctgtg cagtacggca gcttctgcac 2880
 ccagctgaat agagccctga cagggatcgc cgtggaacag gacaagaaca cccaagaggt 2940
 gttgcccaca gtgaagcaga tctacaagac cctctctatc aaggacttgc gcggcttcaa 3000
 tticagccag attctgccc atctagcaa gccagcaag cggagcttca tcgaggacct 3060
 gctgttcaac aaagtacac tggccgacgc cggcttcatc aagcagtatg gcgattgtct 3120
 gggcgacatt gccgccagg atctgattg ccccagaag tttaacggac tgacagtgt 3180
 gccaccactg ctgaccgatg agatgatgc ccagtacaca tctgccctg tggccggcac 3240

aatcacaaagc ggctggacat ttggagctgg cgccgctctg cagatcccct ttgctatgca 3300
gatggcctac cggttcaacg gcatcggagt gaccagaat gtgctgtacg agaaccagaa 3360
gctgatcgcc aaccagtca acagcgccat cggcaagatc caggacagcc tgagcagcac 3420
agcaagcgcc ctgggaaagc tgcaggacgt ggtcaaccag aatgccagg cactgaacac 3480
cctggctaaag cagctgtcct ccaactcgg cgccatcagc tctgtgctga acgacatcct 3540
gagcagactg gacaagggtg aagccgaggt gcagatcgac agactgatca ccggaaggct 3600
gcagtccttg cagacctacg ttaccagca gctgatcaga gccgccgaga ttaggcctc 3660
tgccaatctg gccgccacca agatgtctga gtgtgtgctg ggccagagca agagagtga 3720
cttttgggc aagggtacc acctgatgag ctccctcag tctgccctc acggcgtggt 3780
gtttctgcac gtgacatac tgcccgtca agagaagaat ttaccaccg ctccagccat 3840
ctgccagac ggcaagccc actttcctag agaaggcgtg ttgtgtcca acggcaccca 3900
ttggttcgtg acccagcgga acttctacga gccccagatc atcaccaccg acaacacct 3960
cgtgtctggc aactgcgacg tctgatcgg cattgtgaac aataccgtgt acgacctct 4020
gcagcccag ctggacagct tcaagagga actggataag tactttaaga accacacaag 4080
ccccagctg gacctggcg acatcagcg aatcaatgcc agcgtctga acatccagaa 4140
agagatcgac cggctgaacg aggtggccaa gaatctgaac gagagcctga tgcacctga 4200
agaactggg aagtagcagc agtatcaaa gtggccctgg tacatctggc tgggctttat 4260
cggcgactg attgccatg tgatgtcac aatcatgctg tttgatga ccagctgctg 4320
tagctgcctg aagggtgtt gtatgtggtg cagctgtgc aagttcgac aggacgattc 4380
tgagccgtg ctcaaggag tcaaatata ttacacataa gatatcgcg ccgctcgagt 4440
ctagataact gatcataatc agccatacca cattttaga ggttttactt gctttaaaa 4500
acctccaca cctcccctg aacctgaac ataaatgaa tgcaattgtt gttgttaact 4560
tggtttatg agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaata 4620
aagcatttt ttactgcat tctagtgtg gttgtccaa actcatcaat gtattcta 4678
<210> 5
<211> 33765
<212> DNA
<213> Recombinant human adenovirus serotype 26
<220>
<223> Материнская последовательность рекомбинантного аденовируса человека 26
серотипа, в котором делетированы Е1 и Е3 области, а ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5
<400> 5
catcatcaat aatatacccc aaaaagtaaa caaaagttaa tatgcaaatg agcttttgaa 60
tttaacggt ttggggcgg agccaacgct gattggacga gaaacggtga tgcaaatgac 120
gtcacgacg acggctaacg gtcgcgcgg aggcgtggcc tagcccgaa gcaagtcgag 180
gggctgatga cgtataaaaa agcggacttt agaccggaa acggccgatt ttccgcggc 240
cacgcccga tatgaggtaa ttctggcgg atgcaagtga aattaggtca tttgcccgc 300
aaaactgaat gaggaagtga aaagcgaata ataccggctc ctccaggcg ggaatattta 360
ccgagggccg agagacttg accgattacg tgggggttc gattgcggtg ttttttgc 420
gaatttccg tccgtgtca aagtcgggtg ttatgtcac agatcagctg gtttcttta 480
agatacattg atgagtttg acaaccaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt 540
tgtgaaatt gtgatgctat tgctttatt gtaaccatta taagctgcaa taacaagtt 600
aacaacaaca attgcatca tttatgtt caggttcagg gggaggtgtg ggaggtttt 660
taaaagcaagt aaacctcta caaatgtgt atggctgatt atgatcagtt atctagatc 720
ggtggatcgg atatcttatg tgtaagttaa ttgactcct ttgagcacgg gctcagaatc 780
gtcctcgtcg aactgcagc agctgccaca gctacaacag cccttcaggc agtacagca 840
gctggtcatg caacacagca tgattgtgac catcagatg gcaatcagtc cggcgataaa 900
gcccagccag atgtaccagg gccactgat gtactgctg tactcccca gttcttgag 960
gtcgatcagg ctctcgttca gattcttggc cactcgttc agccggtcga tctcttctg 1020
gatgttcag acgctggcat tgattccgt gatgtcgcc aggtccagct cggggcttgt 1080
gtgttctta aagtacttat ccagttcctc ttgaagctg tccagctcg gctcagagg 1140
gtcgtacacg gtattgttca caatgccgat cagcagctcg cagttgccag acacgaaggt 1200

gttgtcgggt gtgatgatct ggggtcgtga gaagtccgc tgggtcacga accaatgggt 1260
 gccgttggac acgaacacgc ctctctagg aaagtgggct ttgccgtcgt ggcagatggc 1320
 tggagcgggt gtgaattct tctctgagc gggcacgtat gtcactgtca gaacaccac 1380
 gccgtgaggg gcagactgag ggaagctcat cagggtgtag ccttgccgc aaaagtccac 1440
 tctctgtc tggcccagca cactcaga catcttggtg gcggccagat tggcagaggc 1500
 tctaattcgc gcggctctga tcagctgctg ggtaacgtag gtctgcaggg actgcagcct 1560
 tccggtgatc agtctgtcga tctgcacctc ggcttcacc ttgtccagtc tgctcaggat 1620
 gtcgttcagc acagagctga tggcggcga gttggaggac agctgctga ccagggtgtt 1680
 cagtgcctgg gcattctggt tgaccacgtc ctgcagctt cccaggggc ttgtgtgct 1740
 gctcaggctg tcttgatct tgcgatggc gctgtgaac tggttggcga tcagctctg 1800
 gtctcgtac agcacattct ggtcactcc gatccgttg aaccggtagg ccatctgcat 1860
 agcaagggg atctgcagag cgccgccagc tccaaatgc cagccgttg tgattgtgc 1920
 ggccagcagg gcagatgtgt actggcgat catctcatc gtcagcagtg gtgcagcac 1980
 tgcagtcgc taaacttct gggcgaat catatccct gcggcaatg cgcacagca 2040
 atgccatac tgctgatga agccggcgtc ggccagtgct actttgtga acagcaggtc 2100
 ctccgctgc ctccgctgc tgggttgc aggatcggc agaactggtc gaaattgaa 2160
 gccggcgaag tcttgatag gaggggtct gtatctgc ttcactggg cgaacacctc 2220
 ttgggtgtc ttgtctgt ccacggcgat cctgtcagg gctctattca gctgggtgca 2280
 gaagtcgcc tactgcagca gcaggttga gcaactggg gaatcggcg agatgtacat 2340
 ggtgactgc acgtgctgc ttgtcatga cacagcagg atctcttg tcacgtgat 2400
 ggtgaagtgt gtgggtagat cgtgtaggt gttggtagt gccacgtgt tctcggcgc 2460
 cagagacatt gttaggcaa tgatgctct gctggccaca gatctggccc gctcggggt 2520
 gttgtctgt gctggtgag tggcacagat gccacggcg atggggagt cgcactgta 2580
 gctattgtc acgtgctgc ctccatcag acagccgct ctggtctgaa acattgtct 2640
 gccgtggag tacaccgcc atgtaggtgt cagctgatc gctgaatgg ccacgggcac 2700
 ttcggtacag ttcacgtct ggtacagcac tggcactga ttgctggtgt tgggtccagg 2760
 ggtgatcaca gacactcgc cgaagctga aggggtgat tccagattt ccagtgtctg 2820
 gggatctct acgctgctg ttgtatcgc aatatcccg ccaactgct ggaatggcag 2880
 gaactcttg ttgtctctg tcagcagcc ggtgccggtc aggcgttga agtgaagt 2940
 cagcatttg ttctcacga gattggtgt ttcttaggg ccgcacactg tggcaggggc 3000
 atgcagcagt tcgaagctca gcaccaccac tcttagggc tgatagccca gccattgt 3060
 gggctgaaag ccgtaggact gcagtgggaa gtacaggtg aagccttca cgcgttaca 3120
 aggggtgctg ccggcctgat agatcgggt ggaagtgtcc gcctgaagg gctcagatt 3180
 ggaactccg aacagccgt acaggtatg gtatggccg ccgacttgg agtccaggt 3240
 gttgtgttc caggcaatca cacagccgtt gaagtcgtc ggcagctgt agttgtagt 3300
 ggcgatctg cctgtctgtc caggggcaat ctgccgact tcatctccc ggaacagaa 3360
 gctgtcggc tacacgttg tgaagcacag gtcgttcagc ttgtagggg ccacgccga 3420
 gcacttgaag gtctgaagc tggcggagt gtacagcac gagtagtgc ccacgcaat 3480
 gctgatccg ttccggttc aggcgtacac agaggcgaat ctggtggcat tgaacacct 3540
 gccgaagggg cacagattg tgatattgg gaaccgcag atggattcg tgggtgcac 3600
 ccggaagtgt ctggtctgt agatgccct ttccaggtg aaggacttca ggggtcact 3660
 tgtctcgtc agaggatcca gagcacaat caggcgtcgt gtgatgtgc cgttctcgt 3720
 gtacttcagc aggaagggtc taggtgcag gtatccaca tagtaagcg cgccaccagc 3780
 tgcctaccg ctgctgctat cgcagggtg caggtagct ctgtcaggg ccagcaggt 3840
 ctgaaaccgg gtgatgtga tgcgatggg cagatccacc aggggttcca gagcagagaa 3900
 gccctgaggc agatcccgca cgaggtgat aggggtgtgc ttgtgtaga tctgaagta 3960
 gccgtgatg ttctgaaca cgaactcgc caggttctg aagttgccct gcttgcctc 4020
 caggtccatc aggaagggt gggacacgta ctcgaagtg cagttgttg cgtgtctga 4080
 caccgggaac tgccttcca tccagctct gttgtctg tgatagtaga cggcaggaa 4140
 ggggtcgtg cagaactgga actcgcacac ttgatgacc acgttgggtg cgttgtcac 4200
 gatcagcagg ctctgggtct tctgtccag tgtgtgccc aagatccag ctctgatgat 4260
 ttggacttc tgggtctg caaagtacac cccgtctg aagggcagca cgggtgttc 4320

gaatctcttg gtcattgg tgccggacac gtggatggcg tggaaccagg tcacgttgct 4380
 gaagaaaggc aggaacaggt cctgggtaga gtgcagcacg ctgcatctga acaccttgct 4440
 ggggttagtc acgcctctgg taaagctgtt ggtgtaggct ggaggcagct gggttctgt 4500
 ggtcagggtc acacactgac tagagactag tggcaataac acaaggaaaca caaacatggt 4560
 accaagctta ggtcagagcg gccgcgtcga cgtaccaga tctctagcgg atctgacggt 4620
 tcaataaacc agctctgctt atatagacct ccaccgtac acgcctaccg cccatttgcg 4680
 tcaatggggc ggagttgtta cgacattttg gaaagtcctg ttgatttttg tgccaaaaca 4740
 aactcccatg gacgtcaatg ggggtggagac ttggaaatcc cgtgagtc aaccgctatc 4800
 cagcgcattg gatgtactgc caaaaccgca tcaccatggt aatagcgatg actaatacgt 4860
 agatgtactg ccaagtagga aagtcccata aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg 4920
 gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac acttgatgta 4980
 ctgccaaagt ggcagtttac cgtaataact ccaccattg acgtcaatg aaagtcccta 5040
 ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttggcg 5100
 gtcagcaggc cggggccatt accgtaagtt atgtaacgcg gaactccata tatgggctat 5160
 ggaactaaga ccccgtaatt gattactatt aacagtgtt aaacgtatac ctataaaggc 5220
 agcgtgtctta cgagggtctt ttgtctttc tgcagacatc atgaacggga ctggcggggc 5280
 ctgcgaaggc gggcttttta gccctattt gacaaccgcg ctgccgggat gggccggagt 5340
 tctcagaagt gtgatgggat cgacgttgga tgggcgcccc gctgtccag caaatctctc 5400
 gaccatgacc tacgcgaccg tggggaactc tgcgtcgcac agcaccgcg cagccgcggc 5460
 agcgcagcgc gccatgacag cgacgagact gcctcgcagc tacatgccca gcagcggtag 5520
 tagccctctt gtgccagtt ccatcatcgc cgaggagaaa ctgctggccc tgcctggcca 5580
 gctggaagcc ctgagccgcc agctggccgc cctgaccagc caggtgtccg agctcccgca 5640
 acagcagcag cagcaaaata aatgatcaa taaacacaga ttctgatca aacagcaaa 5700
 catcttatt attattttt tcgcgcgcgg taggccctgg tccactctc ccgatctg 5760
 agagtgcggt ggatttttc caggaccggg tagaggtggg attgaggtt gaggtacatg 5820
 ggcagtagcc cgtcccgtag gtggaggtag caccactgca tggcctcgtg ctctggggtc 5880
 gtgtgtaga tgatccagtc atagcagggg cgtggtgggt ggtgctggt gatgtcctt 5940
 agggaggagc tgatggccac ggggagcccc ttggttagg ttgtggcaaa acggttagc 6000
 tgggagggat gcatcgggg gggagatgat tgcagtttg cctggaact gaggttggcg 6060
 atgttccac ccagatccc cggggggttc atgttgca ggaccaccag aacggttag 6120
 cccgtgcat tggggaacti gtcatgaac ttggaaggga atgcgtggaa gaatttggag 6180
 acgccttctg gccgcgccag gtttccatg cactcatca tgatgatgc aatgggccc 6240
 tgggctcgg ctttggcaaa gacgtttctg ggtcagaga catcgttaatt atgtcctg 6300
 gtgagatcat cataagacat ttaataaat ttggggcgga ggggtccaga ttgggggacg 6360
 atgttccct cgggccccgg ggcgaagttc cctgcgaga tctgcatc cagggtttc 6420
 atctcgagg gggggatcat gtccacctgc ggggcgatga aaaaaacggt ttccggggcg 6480
 ggggtgatga gctgcgagga gagcaggtt ctcaacagct gggacttgc gcaccgggtc 6540
 gggccgtaga tgacccgat gacgggtg aggtgtgagt tcaaggacat gcagctgccc 6600
 tcttccgga ggaggggggc cactcgttg agctgtctc tgacttgag gttttcccg 6660
 acgagctcgc cgaggaggcg gtccccgcc agcgagagaa gctcttcag ggaagcaaa 6720
 ttttcaggc gcttgagccc gtccgcatg ggcatttgg cgagggtctg cgagaggagc 6780
 tccaggcgt cccagagctc ggtgacgtgc tctacggcat ctgcatccag cagacttct 6840
 cgttccggg gttgggacga ctgcgactgt agggcacgag acgatggcg tccagcgcg 6900
 ccagcgtcat gtcctccag ggtctcaggg tccgcgtgag ggtggtctc gtcacgggta 6960
 aggggtggc cgcgggctgg gcgttgcaa ggtgtgctt gagactcct ctgctggtgc 7020
 tgaacgggc acggttctc cctgcgcgt cggcgagata gcagtgacc atgagctcgt 7080
 agttgaggc ctgcggcgcg tggcccttg cgcggagcti gcccttgaa gagcggccg 7140
 aggcgggaca gaggaggat tgcaggcgt agagcttgg cgcgagaaag acggaactcg 7200
 gggcgaaggc gtccgctccg cagtggcgcg agacgtctc gcactgact agccaggtga 7260
 gctcgggctg ctgggggtca aaaaccagt ttccccgtt cttttgatg cgcttctac 7320
 ctccgctct catgagctg tctccgct cggtgacaaa caggctgtct gtgtcccg 7380
 agacggacti gatggcgct tctgcaggg gcgtcccg gtcctcctg tagagaaa 7440

cagaccactc tgagacgaag gcgcgcgtcc acgccaagac aaaggaggcc acgtgcgagg 7500
 ggtagcggtc gttgtccacc aggggggtcca cctttccac ggtatgcagg cacatgtccc 7560
 cctcctccgc atccaagaag gtgattggct ttaggtgtga ggccacgtga cctggggttc 7620
 ccgacggggg ggtataaaag ggggcgggtc tgtctcgtc ctactctc tccgcgtgc 7680
 tgtccacgag cgccagctgt tgggttaggt attcctctc aagagcgggc atgacctcgg 7740
 cactcaggtt gtcagttct agaaacgagg aggattgat gtgggcctgc cctgccgcga 7800
 tgcctttag gagacttca tccatctgt cagaaaagac tatitttta ttgtcaagct 7860
 tgggtggcga ggagccatag agggcggttg agagaagctt ggcgatgat ctcattgtct 7920
 gatittgtc acgtcgggc cgctccttgg ccgcgatgt gagctggaca tattcgcgcg 7980
 cgacacactt ccattcgggg aagacgggtg tgcgtcgtc gggcacgatc ctgacgcgcc 8040
 agcccggtt atgcagggtg accagggtcca cgctgggtgc cacctcgcgc cgaggggct 8100
 acatggcga gatgtctg ccgccttgc gcgagcagaa cgggggcagc acatcaagca 8160
 gatcctgc aggggggtcc gcatcgtg tgaagatgcc cggacagagt tcttgtcaa 8220
 aataatcat tttaggat gcatcgtcca aggccatct cactcgcgc gggccacgcg 8280
 ctgcctcga ggggttagg ggcggacccc aaggcatggg atcggtgagg gcggaggcgt 8340
 acatggcga gatgtcatg acatagatg gctccgagag gatccgatg taggtgggat 8400
 agcagcgcgc ccgcgggatg ctgctgcga cgtagtata caactcgtgc gagggggcca 8460
 agaagggcgg gccagattg gtgcgtcggg gctcctcgc gcggaagacg atctggcgaa 8520
 agatggcgtg cgagttggag gagatgtgg gccgttgaa gatgttaaag tggcgtgag 8580
 gcaggcggac cgagtcgcgc atgaagtgcg cgtaggagtc ttgcagctg gcgacgagct 8640
 cggcggtgac gaggacgtcc atggcgcatg agtccagct ttcgggatg atgtcatac 8700
 tgcctctcc ttcttctcc cacagctgc ggttagggc gtattctc tcatcctcc 8760
 agtactccc gagcgggaat cctcatgct ccgcacggta agagccagc atgagaat 8820
 ggttcacggc ctgtaggga cagcagcct tctccacgg gagggcgtaa gcttagcgg 8880
 ccttgccgag cgaggtgtgc gtcaggcga aggtgtccct gacctgact ttaagaact 8940
 ggtactgaa gtccgagtcg tcgcagccgc cgtgctcca gagctgaaa tgggtgcgt 9000
 tcttcgagag ggggttagg agagcgaag tgacgtcatt gaagagaat ttgcctgcc 9060
 gcggcatgaa attcgggtg atgcggaag ggcggggac ggaggctcgg ttgtgatga 9120
 cctgggggc gaggacgac tctcaaaag cgtgatgtt gtgcccgcg atgtagatt 9180
 ccatgaatc cgggcgccct ttgatgtgc gcagctttt gagctcctc taggtgaggt 9240
 cctcggggca ttgcaggccg tctgtctga gcgccactc ctggagatg tgggtgctt 9300
 gcatgaagg agcccagagc tcgcgggcca tgagggtct gagctcgtc gaaagaggc 9360
 ggaactgctg gccacggcc atctttctg ggtgacgca gtagaagtg aggggtccc 9420
 gctccagc atcccagct aaacgcacgg cgagatcgc agcaggggc accagctctg 9480
 ggtcccga gaattcatg accagcatg aggggacgag ctgcttccg aaggaccca 9540
 tccaggtga ggttttaca tctaggtga caaagagcg ctcgtgcga gtagagagc 9600
 cgattggaa gaactggatt tctgccacc agttggacga ttggctgtt atgtgatga 9660
 agtagaact ccgccgcga accgagcact cgtgtgatg ctgtaaaag cgtccgact 9720
 actgcagcg tgcacgggc tgtacctat ccacagata cacagcgcgt cccttgagg 9780
 ggaactcag gattggcgc cctggctgt gttttcatg ttgcctgcg tgggactcac 9840
 cctggggctc ctgaggacg gagaggctga cgagccgcg cgggagccag gtccagatc 9900
 cggcgcggc gggcgggaga gcgaagacga gggcgcgag ttggagctg tccatggtg 9960
 cgcggagatc caggctcggg ggcagggttc tgagggtgac ctgtagagg cgggtgagg 10020
 cgtgcttag atgcagatg tacttgatt ctacgggtga gttgtgtg gtgtccacg 10080
 attgcatg cccgtagctg cgcggggcca cgaccgtgc gcggtgcgt tttagaagc 10140
 gtgtcgcga cgcgtcccc gcggcagcgg cggttccgg cccgcggga gggcgggcag 10200
 aggcacgtc gcgtggcct cgggcaggtc ccggtcgtc gccctgagag cgctggcgtg 10260
 cgcgacgag cggcggttga catctggat ctccgcctc tgcgtgaaga ccacggggcc 10320
 cgtgacttt aacctgaaag acagttaac agaataatc tctgcgtat tgacggcgc 10380
 ctgacgcagg atctttgca cgtcggcca gttgtcgtg taggcgatc cggacatga 10440
 ctgttcgat tctctctc ggagatgcc gcggccgcg cgtccacg tggcgcgag 10500
 gtcattggag atgcgacca tgagctcga gaaggcgc aggcgctct cgttcagac 10560

gcggctgtag accacgtccc cgtcggcgtc gcgcgcgcgc atgaccacct gcgcgaggtt 10620
 gagctccacg tgcgcgcgcaa agacggcgta gttgcgcagg cgctggaga ggtagttgag 10680
 ggtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa gtacatgac cagcggcgca ggggcatctc 10740
 gctgatgtcg ccgatggctt ccagccttc catggcctcg tagaagtcca cggcgaagt 10800
 gaaaaactgg gcgttcgggg ccgagaccgt gagctcgtct tccaggagcc ggaatgattc 10860
 ggcatggtg gcgcgcacct cgcgctcga atccccgggg gcctcctct ctctctctc 10920
 ttcatgacg acctctctt ctattcttc ctctggggg ggtggtggtg gcggggggccg 10980
 acgacgacgg cgagcaccg ggagacggtc gacgaagcgc tcgatcatct ccccgcgcg 11040
 cgacgcacg gtttcggtga cggcgcgacc ccgttcgca ggacgcagcg tgaagacgcc 11100
 gccggctac tcccggtaat gggcgcggtc ccattgggg agcgataggg cgctgacgat 11160
 gcatcttacc aattgcggtg taggggacgt gagcgcgtc agatcgaccg gatcgagaa 11220
 tctttcggg aaagcgtcta gccaatcgca gtcgaaggt aagctcaaac acgtagcagc 11280
 cctcgggacg ctgttagaat tgcggtgtct gatgatgaa ttgaagtagg cgttttgag 11340
 gcggcggtg gttgcgagga ggaccaggtc ctgggtcca gcttctgga tgcggagccg 11400
 ctcggcacg cccagggct ggccctgaca ccggtcagg ttctttagt agtcatgat 11460
 acgacctca atgtcatcac tggctgaggc ggagtcttc atcggggtga ccccgacgcc 11520
 cctgagcggc tgcacgagcg ccaggtcggc gacgacgcgc tcggcgagga tggcctgtt 11580
 caccgggtg aggggtgtct ggaagtctc catgtcgac aagcgggtg agggcccggt 11640
 gttgatgtg taggtgcat tggccatgag cgaccagtt acggcttga ggccgtgctg 11700
 cctgacctcg gattacctga cccgcgagaa ggcgcgcgag tcgaagcgt agtcttga 11760
 ggtgcgcagc aggtactggt atccgactag gaagtgcggc ggcggttggc ggtagagcg 11820
 ccagcgttg gttgccggcg cggcgggggc caggctcctc agcatgaggc ggtgtagcc 11880
 gttagggtag cgggacatcc aggtgatgct ggcgcggtg gtagggcgcg gcgggaactc 11940
 gcggagcgg ttccagatgt tgcgagcgg caggaaatag tccatggtc gcacggtctg 12000
 gccggtaga cgcgcgagc cattgacgt ctgagggcaa aaacgaaagc ggttagcgg 12060
 gcttctctc cgtagcctgg cggacgcaa acgggttagg ccgctgtgt accccgggtc 12120
 gagtccccct gaatcaggct ggagccgca ctacgtgtt atggcactc ccgtctgac 12180
 ccgagccag tagccgccag gatacggcgg agagccctt ttgctggcg aggggggtcg 12240
 ctgactga aagcgaccga aaaccctgc gggtagtggc tcgccccgt agtctggaga 12300
 agcatcgca ggttgatgc gcggcagaac ccgttcgag gacggccgc gcgagcggga 12360
 ctgtgacc ccggcgtat aaagaccac agccagcga ctctccagt tacggagcg 12420
 agccccctt ttcttttg ccagatgat cccgtctgc gccaatgccc tcccacccc 12480
 ccggcgacca ccgcgaccg gcccgtagc ggcgccggcg ctgaccagcc accacagaca 12540
 gagatgact tgaagaggc gaaggcgct gcaagactgg gggcgccgtc cccggagcga 12600
 catccccgc tgcagctga gaaggacgt cggccgctc agtgcctac gcagaacctg 12660
 ttacgggacc cgagcgggga gaggcccgag gagatgcgc actgccgtt tcggcgggc 12720
 agggagctg gcgagggcct ggaccgccag cgcgtgtct gcgacgagga tttagagccg 12780
 aacgagcaga cgggatcag cccgcacgc gcgcacgtg cggcagcga cctggtgacg 12840
 gcctacgagc agacggtgaa gcaggagcg aactccaaa agagttaaa caaccacgtg 12900
 cgacacctga tcgcgcgca ggaggtggc ctgggcctga tgcacctgt ggacctggcg 12960
 gaggccatg tgcagaacc ggacagcaag cctctgacgg cgcagctgt cctggtgtg 13020
 cagcacagca gggacaacga ggcgttcagg gagcgctgc tgaacatgc cgagcccag 13080
 ggtcgtggc tgcgtgagc gattaacatc ttgagagca tcgtagtga ggagcgacg 13140
 ctgagcctg ccgagaaggt ggcgcgatc aactactcg tctgagcct gggaagt 13200
 tacgcgcga agatttcaa gacgccgtac gtgccatag acaaggaggt gaagatagac 13260
 agctttaca tgcgcatggc gctcaagggt ctgacgtga gcgacgacct gggcgtgtac 13320
 cgcaacgacc gcatccaaa gcccgtagc acgagccggc ggcgcgagct aagcgaccg 13380
 gagctgatg tgaatctgc cggggcgtg gtagggggcg ccgcccggcg cgaggagtc 13440
 tacttcgaca tgggtcggga cctgattgg cagccgagc ggcgccctt ggagccggc 13500
 tacggtttag aggacttga taggaagag gaagaggagg aggatgacc cgctgcgggg 13560
 tactgagcc tccgtgatg gtttttagt gtccagcaa gccccgacc ccgcataag 13620
 ggcgcgctg caaagccagc cgtccgtct agcatggag gactggagg ccgcgatga 13680

acgcatcatg gccctgacga cccgcaaccc cgagtccttt agacaacagc cgcaggccaa 13740
 cagactctcg gccattctgg aggcgggtgg cccctctcgg accaaccca cgcacgagaa 13800
 ggtgctggcg atcgtgaacg cgttgccgga gaacaaggcc atccgtccc acgaggccgg 13860
 ctgtgtgtac aagccctgc tggagcgtg gggccgtac aacagcacga acgtgcagtc 13920
 caacctgag cggctggtga cggacgtgcg caggccgtg gcgagcgcg agcgttcaa 13980
 gaacgagggc ctgggctcgc tgggtgcgct gaacgcctc ctggcaacgc agccggcgaa 14040
 cgtgccgcgc gggcaggacg attacacaa cttatcagc gcgtgcggc tgatggtgac 14100
 cgaggtgccc cagagcgagg tgtaccagtc tggccggac tactttcc agacgagccg 14160
 gcagggttg cagacgtga acctgagcca ggctttcaag aatctgcgc ggctgtgggg 14220
 cgtgcaggcg cccgtggcg accggtcaac ggtgagcagc ttgtgacgc ccaactcgcg 14280
 gctgctgctg ctgctgacg cgccttcac gcacagcgc agcgtgaacc gcaactcgtg 14340
 cctgggcat ctgctgacg tgtaccgga ggccataggc caggcgcagg tggacgagca 14400
 gacctccag gagatcacta gcgtgagccg cgcgtggggc cagaacgaca ccgacagtct 14460
 gagggccacc ctgaacttt tctgaccaa tagacagcag aagatcccgc cgcagtagcg 14520
 actgtcggc gaggaggaag gattctgag atatgtcag cagagcgtg ggctgttct 14580
 cgacgtggag ggtgccacc ccagcgcgc gctggacatg accgcgcga acatggaacc 14640
 tagcatgtac cccgccaacc ggcgttcac caataagctg atggactact tgcaccgcgc 14700
 gggtgcatg aacacggact acttaccac gcctacctg aaccgcact ggctccgcc 14760
 cgcggggtg tacacggcg agtacacat gccgacccc aacgacgggt tctgtggga 14820
 gcacgtggac agcgcgtgt tctgccgac cttcaaaag cgcagggagg cccgcccag 14880
 cgaggcgcg gtgggagga gcccttcc tagctaggg agttgcata gcttccggg 14940
 ctgggtgaac agcgcaggg tgagccggc gcgttctg gcgcagagc agtacctgaa 15000
 cgactcgtg ctgcagccg cgcgggcca gaaccatg gccataacg gatatagag 15060
 tctgtggac aaactgaacc gctggaagc ctacgtcag gaccatagg acgcgccgc 15120
 gccgcggcga cagcgccac accggcagc gggcctgtg tggagcagc aggaactggc 15180
 cgacgatagc agcgtgttg acttggcgc gagcgtggg gtcaaccgt tccgcagtc 15240
 gcagccaaa ctgggcgcg gtagtgttg aatgaataa aactaccaa gccatagcg 15300
 tctgtctct tctgttag agatgagcg cgcgtgtg tctctctc tctctccc 15360
 gtacgagagc gtatggcg aggcgacct ggaggtccg ttgtgcctc cgcgttat 15420
 ggctctacg gagggcagaa acagcttcg ttactcgag ctggtccgc agtacgac 15480
 cactgcgtg tacttggtg acaacaagc ggcggacatc gttccctga actacaaa 15540
 cgaccacag aacttctga ccacgtgtg gcagaacaac gatttacc ccgccgagc 15600
 cagcagcag acgataaatt ttacgagcg gtcgcgttg ggcgtgac tgaagaccat 15660
 tctgcacat aacatccca atgtgaacg gtacatgtc accagcaag ttaaggcgcg 15720
 ggtgatgtg tctaggaag atccagagg gtagttgaa acagattga gtcaggataa 15780
 gcttgaatat gagtgttg agttaccct gccgaggga aactttcc agaccatgac 15840
 catagacctg atgaacaac ccatcttga aaactactg caagtgggc ggcagaatg 15900
 cgtgctggag agcgatcgc gagtcaagt ttacagcaga aattcaagc tgggctggga 15960
 cccgtgacc aagctgtga tggcagggt ctacacctac gaggcctcc acccgacgt 16020
 ggtgctcgt ccggcgtcg ggttgactt caccgagagc gcctgagca acctctgg 16080
 cattcgcaag aagcaacct tcaagagg cttcagaatc atgtatagg atctagaagg 16140
 tggcaacat cccgccctcc ttgatgtcc caagtactg gaaagcaaga agaaagttga 16200
 agcgaact aaaaatgcag ctgcggccac agccgataca accactagg gtgatacat 16260
 tgcaactcca cgcgaagaga cagcagctga taagaaggta gaagtcttc cattgaaa 16320
 gtagtagagt gtagaagt acaacctg caggggacc cagacacgc tttaccgag 16380
 ttggtactg tctatact acggggacc cgagaagggt gtgcagtcgt ggacgtgct 16440
 caccacccg gacgttact gggcgcgga gcaagtctac tggctactgc cggacctcat 16500
 gcaagacccc gtcacttcc gtcaccca gcaagtacg aactacccc tggtcggcg 16560
 ctagctcatg ccttccgcg ccaagagct ttacaacgac ctgccgtct actccagct 16620
 catccgcagc tacactccc taccacgt cttaaccgc tccccgaca accagatcct 16680
 ctgcgcccg cccgcgcca ccatcaccac cgtcagtga aacgtgctg ctctcacaga 16740
 tcacgggacg ctaccgtgc gcagcagtat ccgcggagtc cagcagtgga ccgtcactga 16800

cgccccgtcgc cgcacctgtc cctacgtcta caaggccctg ggcatagtcg cgccgcgcgt 16860
 gctttccagt cgcaccttct aaaaaatgt ctattctcat ctgcccage aataacaccg 16920
 gtgggggtct tactagacc agcaccatgt acggaggagc caagaagcgc tcccagcagc 16980
 accccgtccg cgtgcgcacc accgtcgacg acgtcatcga ctgggtggtc gccgacgcgc 17040
 ctccaccgc cgtgcgcacc accgtcgacg acgtcatcga ctgggtggtc gccgacgcgc 17100
 gcaactacac tcccggccc tccaccgtgg agcgggtcat cgacagcgtg gtggcgcagc 17160
 cgcgcgacta tgcagacgc aagagccggc ggccagcgat cgccaggcgc caccggagca 17220
 cgccgccat gcgcgcgcgc ggggtcttgc tgcgcgcgc cagacgcagc ggccgcggg 17280
 ccatgatgag agccgcgcgc cgcgctgcca ctgcaccac cccgcaggc aggaactcgca 17340
 gacgagcggc cgccgcgcgc gctgcggcca tcttagcat gaccagacc aggcgcggaa 17400
 acgtgtactg ggtgcgcgac tccgtcacgg gcgtgcgcgt gcccggtgcgc accgtcctc 17460
 ctgctccgtg atctaagtct tctgtcctcc ccgcaagcg acgatgtcaa agcgcaaat 17520
 caaggaggag atgctccagg tctgcgccc ggagatttac ggaccacccc aggcggacca 17580
 gaaacccgc aaaaatcaagc ggggtaaaaa aaaggatgag gtggacgagg ggcagtaga 17640
 gttgtgcgc gagtgcctc cgcggcggcg cgtaaattgg aaggggcgca ggtgcagcg 17700
 cgtgttgcgc cccggcacgg cgtgtgtgtt cagcccggc gagcgtctct cgttcaggag 17760
 caagcgtagc tatgacgagg tttacggcga cagacacatc ctggaccagg cggcggagcg 17820
 ggccggcgag ttcgctacg ggaagcggtc gcgcgaagag gactgatct cgtgccgct 17880
 ggacgaaagc aacccacgc cgagcctgaa gccgtgacc ctgcagcagg tctgcccga 17940
 ggcggtgctg ctccgagcc gcgggggtcaa gcgcgagggc gagagcatgt acccgacct 18000
 gcagatcatg gtgccaagc gccggcgct ggagacgtg ctggaccagg tgaatatgga 18060
 tttggagccc gaggtaagg tgcgcccac caagcaggtg gcgcggggc tggcgctgca 18120
 aaccgtggac atcagatcc ccaccacat ggtgtcgac aaaaaacct cgaccagcat 18180
 cgagtgcaa accgacctt gggtcccagc ctccaccgt accgtctca ctctaccgc 18240
 cgcccggtt accgacctt ccaggaggcg aagatggggc gccgccagcc ggtgatgcc 18300
 caactcgtg ttcatcctt ccatcatccc gacgcccggc taccggcga cccggtacta 18360
 cgccagcgc cgccggccag ccagcaaac ccgcccgcgc accgccacc gccgcgtct 18420
 agtggcggtt tctgcccgc cgtgtgacc gcgcggggc cgtcgtctg tctgcccac 18480
 cgtgcgtac caccagca tctttaatt cgtgtgctg gatactgtg cagagagatg 18540
 gctctactt gccgcctgc catcccgct ccgaattacc gaggaagatc ccgcccagc 18600
 agaggcatgg caggcagcg cctgaaccgc cgccggcggc ggccatgag caggcgctg 18660
 agtggcggtt tctgcccgc cgtcatccc ataatcgcc ggccattgg cagatccc 18720
 ggcatagct cgttgcgt gcaggcgtc cagcgccgt gatgtcgaa taaacctct 18780
 ttgactctg acacacctg tctgtatat tttagaatg gaagacatca atttgcgtc 18840
 cctggctccg cgcacggca cgcggccgtt catgggcacc tggaaacaga tcggcaccag 18900
 ccagctgaac gggggcgct tcaattggag cagtgtctg agcgggcta aaaatttcg 18960
 ctgcagctc cggacctat ggaacaaggc ctggaatagt agcacgggc agttgtaag 19020
 gaaaaagctc aaagacaaa actccagca gaaggtggtg gacgggctg cctcggcat 19080
 taacgggtg gtgacatcg cgaaccaggc cgtgcagcg gagataaca gccgcctgga 19140
 ccgcggcgc cccaggtgg tggagatgga agatgcaact ctccgccc ccaaggcga 19200
 aaagcggcg cgcccgacg cggaggagac gatcctgag gtggacgagc cgccctgta 19260
 cgaggagccc gtcaaggccg gcatgccac cagcgcatc atcgccgcg tggccaggg 19320
 tgtaatgaaa cccgccacc ttgacctgc tccaccacc gcgcccgtc caccgaaggc 19380
 aactccggtt gtgcaggccc cccgggtggc gaccgccgtg cccgcgtcc ccgcccgcg 19440
 ccaggccag aactggcaga gcacgctgca cagtatctg ggcctgggag tgaagtct 19500
 gaagcgcgc cgtatctatt gagagagagg aaaggagaca ctgaaggag agcttaact 19560
 gtatgtgct taccgcaga gaacgcgga agatggccac cccctcgatg atgccagat 19620
 gggcgatcat gcacatgcc gggcaggacg cctcgagta cctgagccc ggtctggtc 19680
 agtttcccc cgccaccgac acgtacttca gcctgggcaa caagttagg aacccacgg 19740
 tggcccgac ccacgatgt accacggacc ggtccagcg tctgacgtg cgttcgtg 19800
 ccgtggatg cgaggacacc acgtactgt acaaggcgc ctactctg gccgtggcg 19860
 acaaccgggt gtagacatg gccagcatt acttgacat ccgcgcgctc ctggaccgcg 19920

gtccagctt caaacctac tgggcacgg cctacaacag cctggctccc aagggtgccc 19980
 ccaatccag tcagtgggaa acaaaagaaa agcaagggaac tactggagga gtgcagcaag 20040
 aaaaagtgt cacaanaa tttgtgtgg ctgccaccgg cggaattaat ataacaacc 20100
 agggctgttt actaggaact gacgaaccg ctgagaatgg caaaaagac attatgcag 20160
 acaagacttt ccagccagaa cctcaagttg gagaagaaaa ctggcaggaa aatgaagcct 20220
 tctatggagg aagggtcttt aaaaaggaca ctaaaatgaa accatgctat ggatctttt 20280
 ctgacctac taatgagaaa ggaggtcagg caaagtcaa accagttaat gaaggagaac 20340
 aacctaaaga tctggatata gattttgctt actttgacgt cctggcggga agtcctccag 20400
 cagggtggat tggggaagaa tacaagcag atataatgt gtacactgaa aatgtaac 20460
 ttgaaacacc agacactcat gtggtttaca agccagggaac ttacagataac agttcagaaa 20520
 tcaatctgtt tcagcagtc atgccaaca gacccaacta cattggcttt agggacaact 20580
 tttaggtct catgtattac aacagcaccg gaaatatggg tgtgctggct ggtcaggctt 20640
 ctgagtgaa cgtgtgtgtc gacttgcaag acagaacac cgagtatct taccagctat 20700
 tgctagattc tctgggtgac agaaccagat actttagcat gtggaactct gcggtggaca 20760
 gttacgatcc agatgtcagg atcattgaaa atcacggtgt ggaagatgaa cttcaaac 20820
 attgtctccc attgaatggc actggaacca attcactta tcaagtgta aagattaca 20880
 atggtaatga tgggtctgaa gaaagtgtt gggagaaga cgaatgcaatt tctagacaa 20940
 accaaatctg caagggaact gtctacgcca tggagatcaa cctgcaggcc aacctgtgga 21000
 agagtgttt gtactgaac gtggccctgt acctgcccga ctctacaag tacagcccg 21060
 ccaactgcaa gctgcccgcc aacaccaaca cctacagta catgaacggc cgcgtggtag 21120
 cccagtgcct ggtggacgcc tacatcaaca tggcgcccg ctggtcgttg gacccatgg 21180
 acaactgcaa cccctcaac caccaccgca atgcccgcct gcgtaccgc tccatgtgc 21240
 tgggcaacgg ccgtactgt ccttccaca tcaagtgc ccaaaagttc ttgccatca 21300
 agaactgct cctgtcccg ggctcctaca cctacagtg gaactccgc aaggacgtca 21360
 acatgatct cgagagtcc ctgcgaacg acctgcgct cgacggcgcc tccgtccgt 21420
 tgcacagcgt caactatata gccactttt tcccattgg gcacaacac cttcaacct 21480
 tggagccat gctgcgaac gacaccaacg accagtctt caacgactac ctctggccg 21540
 ccaactgct ctacccatc cggccaagg ccaccaactg gccatctcc atccatcgc 21600
 gcaactgggc cgccttccg ggtggagtt tcacccggct caagaccaag gaaactcct 21660
 ccctcgctc ggtttcgac cctactttg tctactggg ctccatccc tacctcgac 21720
 ggaccttcta ctcaaccac acctcaaga aggtctcat catgtcgac tctcgtga 21780
 gctggcccg caacgaccg ctgctcacg cgaacgagtt cgagatcaag cgcagcgtc 21840
 acggggaggg ctacaactg gcccaatgca acatgaccaa ggaactggtc ctgctcaga 21900
 tgctctcca ctacaacatc ggctaccag gcttccact gcccgaggc tacaaggacc 21960
 gcatgtact cttctccg aactccagc ccatgagcag gcaggtggc gatgagatca 22020
 actacaagga ctacaaggc gtaccctgc cttccagca caataactc ggctcaccg 22080
 gctactctc acccaccatg cggcaggggc agccctacc ccgcaactc cctaccgc 22140
 tcatcggtca gacagcgtg cctccgtca ccagaaaaa gttctctgc gacagggtca 22200
 tgtggcgcat cctactcc agcaactca tctcatggg cgcctcacg gactgggtc 22260
 agaactgct ctacccaac tggcccaag cgtctgacat gacctcgag gtggaccca 22320
 tggatgagcc caccctctc tatctctct tgaagtttt cgactgggtc agagtacac 22380
 agccgacccg cggcgtcatc gaggcgctt acctcgccac gccctctcc gccgcaacg 22440
 ccaccacta agcatgagc gctccagca acgagagtc gcggccatc tgcgcagct 22500
 gggctgggg cctacttt tgggaccca cgacaagcgc ttccggggt tctcgcggg 22560
 cgacaagctg gctgcgcca tctgaacac ggccggccgc gagaccggag gcgtgactg 22620
 gctcgcctt ggctggaac cgcgtctcg cactgctac atgtcgacc ctttgggt 22680
 ctggaccgc cggtcaagc agattacag ctctgagtc gaggccatc tgcggccag 22740
 cgccctggc tctcggccg accgtgtct cagctcgag cagtcactc agaccgtga 22800
 ggggcccgac tccgcccct gggactctt ctgtgcatg ttctgcatg cctctgtga 22860
 ctggcccgac cgaccatgg acggaaccc caccatgaac ttgtgacgg ggggtccca 22920
 cggcatgcta caatgccac aggtgtgct caccctcagg cgcaaccagg aggaactcta 22980
 ccgtctctc gcggccact cccctactt tctctccac cgcggccga tgaacacg 23040

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

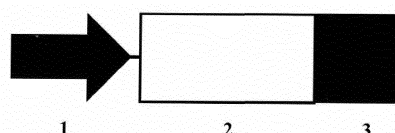
4. Фармацевтическое средство по пп.1-3, отличающееся тем, что оно находится в жидкой или лиофилизированной форме.

5. Фармацевтическое средство по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для жидкой формы содержит, мас. %: трис от 0,1831 до 0,3432, хлорид натрия от 0,3313 до 0,6212, сахара от 3,7821 до 7,0915, магния хлорида гексагидрат от 0,0154 до 0,0289, ЭДТА от 0,0029 до 0,0054, полисорбат-80 от 0,0378 до 0,0709, этанол 95% от 0,0004 до 0,0007, вода - остальное.

6. Фармацевтическое средство по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для лиофилизированной формы содержит, мас. %: трис от 0,0180 до 0,0338, хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957, сахара от 5,4688 до 10,2539, магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028, ЭДТА от 0,0003 до 0,0005, полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070, вода - остальное.

7. Фармацевтическое средство по пп.1-3, отличающееся тем, что компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

8. Применение фармацевтического средства по пп.1, 2 или 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, включающее использование компонента 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.



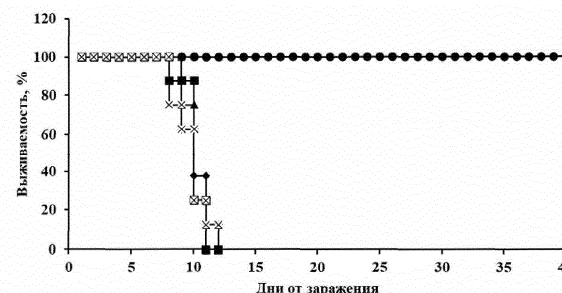
Фиг. 1



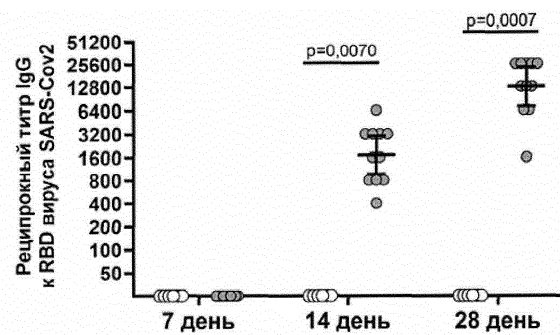
Фиг. 2



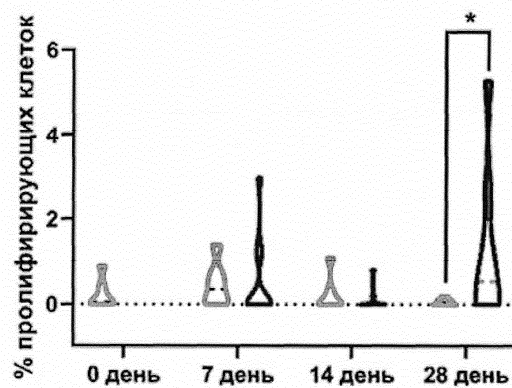
Фиг. 3



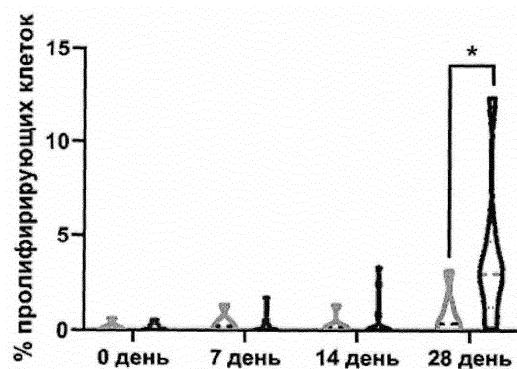
Фиг. 4



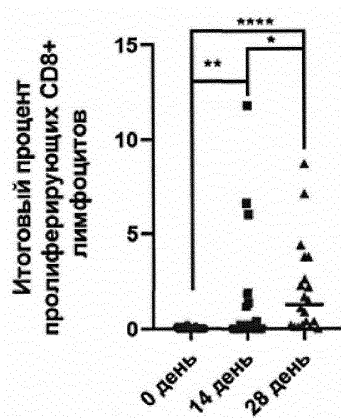
Фиг. 5



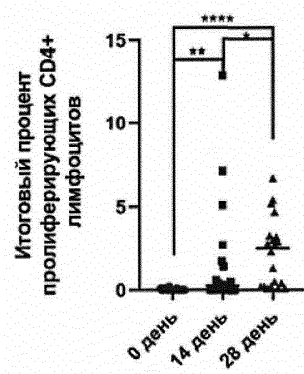
Фиг. 6



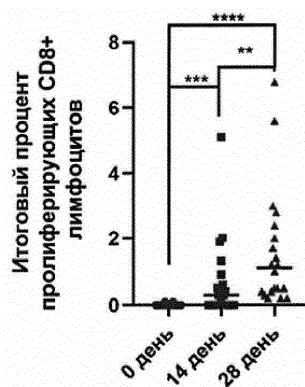
Фиг. 7



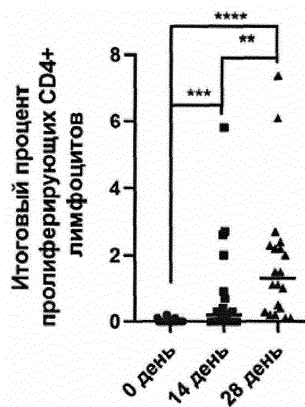
Фиг. 8



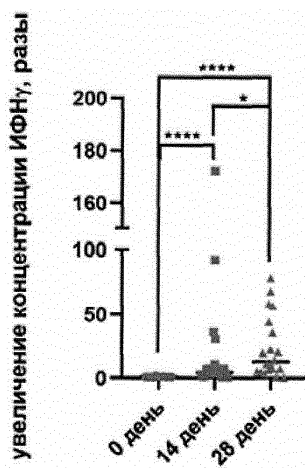
Фиг. 9



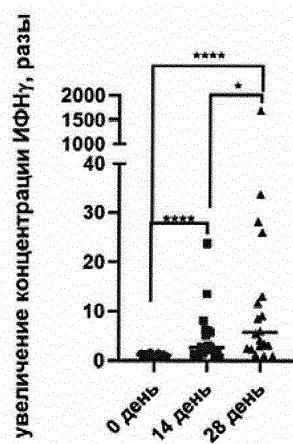
Фиг. 10



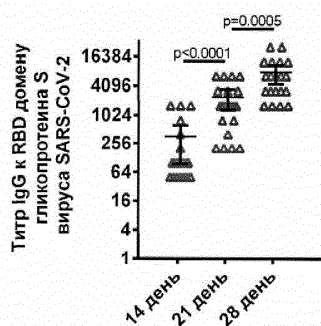
Фиг. 11



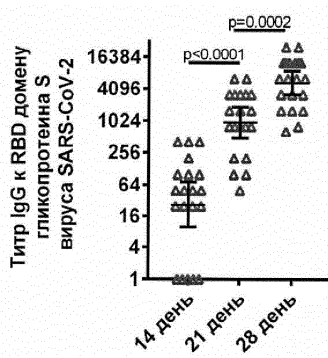
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

