

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202000370** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.02

(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

(86) PCT/RU2020/000591

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

(72) Изобретатель:

**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Должикова Инна Ваимовна,
Попова Ольга, Щебляков Дмитрий
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)

(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 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

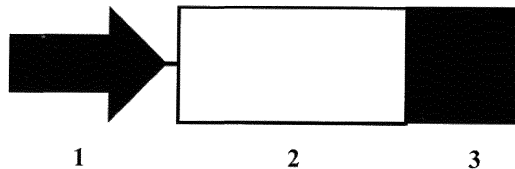
A1

202000370

202000370

A1

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 компоненты 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.



Перевод

**ПЕРЕВОД международной заявки № PCT/RU2020/000591
(дата международной подачи 09.11.2020)**

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

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 года количество заболевших превысило 17,5 млн человек, а количество погибших - 683 тыс. человек.

Коронавирус передается от человека к человеку воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактными 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 US7452542B2), в котором для профилактики заболеваний, вызванных коронавирусом, используют живую аттенуированную вакцину. Данная вакцина содержит живой аттенуированный коронавирус, который характеризуется как содержащий геном, кодирующий (i) EхoN, 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 (WO2006136448A2), 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 2 332 457 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 (WO2016116398A1), 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 (WO2006071250A2), где в качестве вакцины против SARS-CoV предложено использование векторных систем на основе поксвирусов и бакуловрусов, содержащих гены S белка SARS-CoV и его антигенных фрагментов.

Известно решение (CN1276777C), 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 коронавирусам, поражающим летучих мышей (bat-SL-CoVZC45, bat-SL-CoVZXC21), чем к коронавирусам, циркулирующим в человеческой популяции. Так, например, S белок SARS-CoV-2 гомологичен S белку SARS-CoV не более, чем на 75% (Zhou P, Yang XL, Wang XG, 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 FC, Guan XH, Li YH, 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 adenovirus26-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 adenovirus5-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 adenovirus26-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 adenovirus5-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, масс %:

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, масс %:

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 дня 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 моноклеарных 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 день 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 моноклеарных 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 день 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 иммунный ответ, обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого антигена.

Вместе с тем клиническое применение данных векторов может быть затруднено из-за наличия у части населения предсуществующего 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 SC, 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 предсуществующего 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 фигуре 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 YL., Li YC., Jing CQ., Guo X., Shang XF., Zhao CP., Wang TY. 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 1 β (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 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 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 разработанную фармацевтическое средство как в замороженном виде при температуре ниже -18°C , так и в виде лиофилизата при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$.

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 концевого 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 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-эxon) 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 линеаризовали 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 гидролизовали 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 adenovirus26-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 adenovirus26-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 гидролизovali 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 промотор, 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-ехон) 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 НЕК293. 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 adenovirus5-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 adenovirus5-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 adenovirus5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области:

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus5-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 adenovirus5-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 adenovirus5-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 adenovirus5-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 adenovirus5-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 adenovirus5-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 (таблица 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, $1 \cdot 10^{11}$ 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, $1 \cdot 10^{11}$ 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, $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц.

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

Таблица 1 - Состав экспериментальных буферных растворов для жидкой формы фармацевтического средства.

Таблица 1.

№ групп	Состав буферного раствора						
	Трис (мг)	Хлорид	Сахароза (мг)	Магния хлорида	ЭДТА (мг)	Полисорбат -80 (мг)	Этанол 95%

		натрия (мг)		гексагидра т (мг)			(мг)	
1	0,96 8	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
2	1,81 5	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	0,015 2	0,25	0,0025	до 0,5 мл
10	1,21	2,19	25	0,102	0,028 5	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	0,0037 5	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°C 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 (масс %):

Трис: от 0,1831 масс. % до 0,3432 масс. %;

Хлорид натрия: от 0,3313 масс. % до 0,6212 масс. %;

Сахароза: от 3,7821 масс. % до 7,0915 масс. %;

Магния хлорида гексагидрат: от 0,0154 масс. % до 0,0289 масс. %;

ЭДТА: от 0,0029 масс. % до 0,0054 масс. %;

Полисорбат-80: от 0,0378 масс. % до 0,0709 масс. %;

Этанол 95%: от 0,0004 масс. % до 0,0007 масс. %;

Растворитель: остальное.

Для определения концентрации веществ, входящих в состав буферного раствора для лиофилизированной формы фармацевтического средства, было получено несколько вариантов экспериментальных групп (таблица 2). 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, $1 \cdot 10^{11}$ 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, $1 \cdot 10^{11}$ 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, $1 \cdot 10^{11}$ 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.

Таблица 2.

№ групп	Состав буферного раствора						
	Трис (мг)	Хлорид натрия (мг)	Сахароза (мг)	Магния хлорида гексагидрат (мг)	ЭДТА (мг)	Полисорбат-80 (мг)	Вода
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
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	0,0030 4	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°C 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 масс. % до 0,0338 масс. %;

Хлорид натрия: от 0,1044 масс. % до 0,1957 масс. %;

Сахароза: от 5,4688 масс. % до 10,2539 масс. %;

Магния хлорида гексагидрат: от 0,0015 масс. % до 0,0028 масс. %;

ЭДТА: от 0,0003 масс. % до 0,0005 масс. %;

Полисорбат-80: от 0,0037 масс. % до 0,0070 масс. %;

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 18г. Все животные были разделены на 31 группу по 5 животных, которым внутримышечно вводили компонент 1 фармацевтического средства в дозе 10^8 вирусных частиц/100мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе 10^8 вирусных частиц/100мкл. 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 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
- 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 часа.
- 3) Методом 2-х 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 часа 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 часа при 37°C .

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут 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 таблице 3.

Таблица 3 - Титр антител к белку S в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител).

Таблица 3

№	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	фосфатно-	
1	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), $5 \cdot 10^6$ в.ч.;
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2), $5 \cdot 10^6$ в.ч.;
- 3) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2), $5 \cdot 10^6$ в.ч.;
- 4) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad26-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^6$ в.ч.;
- 5) Ad5-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^6$ в.ч.;
- 6) simAd25-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^6$ 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.

Таблица 4.

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, следовательно, 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/100мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе 10^8 вирусных частиц/100мкл. 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 (компонент1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), фармацевтическое средство по варианту 2 (компонент1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: simAd25-CMV-S-CoV2) фармацевтическое средство по варианту 3 (компонент1: 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-Ат 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 однослойном 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 вируссодержащей 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 минут при температуре от 36,5 до 37,5 °С, затем вносили по 0,5 мл на монослой клеток VeroC1008, предварительно удалив ростовую среду. После адсорбции комплекса антиген+антитело на клетках в течение 60 минут при температуре от 36,5 до 37,5 °С 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 °С 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 часов при температуре от 36,5 до 37,5°С, 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 раствора фиколла.

Принцип метода основан на различии в плавучей плотности форменных элементов крови. Раствор полисахарида фиколла 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 фиколла. 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 1мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 часа 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 фиколла. 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 1мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 часа 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 цитофлюориметра 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 часа 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 днем 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 днем 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 день, 21 день, 28 день у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли сыворотку.

Титр антител к домену RBD 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 cattagtcca tagcccatat atggagtcc gcgttacata 60
acttacggt aatggccgc ctggctgacc gccaacgac cccgcccatt tgacgtcaat 120
aatgacgtat gtcccatag taacgccaat agggacttc cattgacgtc aatgggtgga 180
gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 240
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagc acatgacctt 300
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 360
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 420
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc 480
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc gtaggcgtg tacggtggga 540
ggtctatata agcagagctg gtttagtgaa ccgtcagatc cgtagagat ctggtaccgt 600
cgacgcggcc gtcgagcct aagcttggtta ccatgtttgt gttccttggt ttattgccac 660
tagtctctag tcagtgtgtg aacctgacca caagaacca gtcgctcca gcctacacca 720
acagctttac cagaggcgtg tactaccccg acaaggtgtt cagatccagc gtgtgcact 780
ctaccagga cctgttctg cttttctca gcaacgtgac ctggttcac gccatccacg 840
tgtccggcac caatggcacc aagagattcg acaacccctg gtcgcccctc aacgacgggg 900
tgtactttgc cagcaccgag aagccaaca tcatcagagg ctggatcttc ggcaccacac 960
tggacagcaa gaccagagc ctgtgatcg tgaacaacgc caccaacgtg gtcataaag 1020
tgtgcgagtt ccagttctgc aacgaccctt tctgggcgt ctactatcac aagaacaaca 1080
agagctggat ggaaagcag ttccgggtgt acagcagcgc caacaactgc accttcgagt 1140
acgtgtccca gcctttcctg atggacctgg aaggcaagca gggcaacttc aagaacctgc 1200
gcgagttcgt gttcaagaac atcgacggct actcaagat ctacagcaag cacacccta 1260
tcaacctcgt gcgggatctg cctcagggtt tctctgctt ggaacccctg gtggatctgc 1320
ccatggcat caacatcacc cgtttcaga cactgctggc cctgcacaga agctacctga 1380
cacctggcga tagcagcagc ggatggacag ctggtgccgc cgcttactat gtgggctacc 1440
tgcagcctag aaccttctg ctgaagtaca acgagaacgg caccatcacc gacgccgtgg 1500
attgtgctct ggatcctctg agcagacaa agtcaccct gaagtccttc accgtggaaa 1560
agggcatcta ccagaccagc aacttccggg tgcagcccac cgaatccatc gtgcgggtcc 1620
ccaatatcac caatctgtgc ccttcggcg aggtgttcaa tgccaccaga ttcgctctg 1680
tgtacgcctg gaaccggaag cggatcagca attgcgtggc cgactactcc gtgctgtaca 1740
actccgccag cttcagcacc ttcaagtgt acggcgtgtc ccctaccaag ctgaacgacc 1800
tgtgttcac aaacgtgtac gccgacagct tctgtatccg gggagatgaa gtgcggcaga 1860
ttgccctgg acagacaggc aagatcgccg actacaacta caagctgcc gacgacttca 1920
ccggctgtgt gattgcctgg aacagcaaca acctggactc caaagtcggc ggcaactaca 1980
attacctgta ccggctgttc cggaagtcca atctgaagcc cttcgagcgg gacatctcca 2040

ccgagatcta tcaggccggc agcaccctt gtaacggcgt ggaaggcttc aactgctact 2100
 tccactgca gtctacggc tttagccca caaatggcgt gggctatcag ccctacagag 2160
 tgggtggtgt gagcttcgaa ctgctgcatg ccctgccac agtgtgcggc cctaagaaaa 2220
 gcaccaatct cgtgaagaac aatgcgtga acttcaact caacggcctg accggcaccg 2280
 gcgtgctgac agagagcaac aagaagtcc tgccattcca gcagtttggc cgggatattg 2340
 ccgataccac agacgccgta cgagatcccc agacactgga aatcctggac atcaccctt 2400
 gcagcttcgg cggagtgtct gtgatcacc ctggcaccaa caccagcaat caggtggcag 2460
 tgctgtacca ggacgtgaac tgtaccgaag tgcccgtggc cattcacgcc gatcagctga 2520
 cacctacatg gcgggtgtac tccaccggca gcaatgtgt tcagaccaga gccggctgtc 2580
 tgatcggagc cgagcacgtg aacaatagct acgagtgcga catcccatc ggcgctggca 2640
 tctgtgccag ctaccagaca cagacaaaca gcccagacg gccagatct gtggccagcc 2700
 agagcatcat tgctacaca atgtctctgg gcgccgagaa cagcgtggcc tactccaaca 2760
 actctatcgc tatccccacc aacttcacca tcagcgtgac cacagagatc ctgcctgtgt 2820
 ccatgaccaa gaccagcgtg gactgcacca tgtacatct cggcgattcc accgagtgt 2880
 ccaacctgt gctcagtag ggcagcttct gcaccagct gaatagagcc ctgacaggga 2940
 tcgccgtgga acaggacaag aacacccaag aggtgttcgc ccaagtgaag cagatctaca 3000
 agaccctcc tatcaaggac ttcggcggct tcaatttcag ccagattctg cccgatccta 3060
 gcaagcccag caagcggagc ttcacgagg acctgctgt caacaaagt acactggccg 3120
 acgccggct catcaagcag tatggcgatt gtctggcgga cattcccgc agggatctga 3180
 ttgcccga gaagttaac ggactgacag tgctgccacc actgtgacc gatgagatga 3240
 tcgccagta cacatctgcc ctgtggccg gcacaatcac aagcggctgg acattggag 3300
 ctggcggcg tctgcagatc cctttgcta tgcagatggc ctaccggtc aacggcatcg 3360
 gagtgaccaa gaatgtgtg tacgagaacc agaagctgat cgccaaccag ttcaacagcg 3420
 ccatcggcaa gatccaggac agcctgagca gcacagcaag cgccctggga aagctgcagg 3480
 acgtggtcaa ccagaatgcc caggcactga acacctggt caagcagctg tctccaact 3540
 tcggcgccat cagctctgt ctgaacgaca tctgagcag actggacaag gtggaagccg 3600
 aggtgcagat cgacagactg atcaccgga ggctgcagtc cctgcagacc tacgttacc 3660
 agcagctgat cagagccgcc gagattagag cctctgcaa tctggccgcc accaagatgt 3720
 ctgagtgtgt gctgggccag agcaagagag tggactttg cggcaagggc taccactga 3780
 tgagttccc tcagtctgcc cctcacggcg tgggtttct gcacgtgaca tacgtgccg 3840
 ctcaagagaa gaatttacc accgtccag ccacttgcca cgacggcaaa gccacttc 3900
 cttagaagg cgtgtctgt tccaacggca cccattggt cgtgaccag cggaactct 3960
 acgagccca gatcatcacc accgacaaca cctcgtgtc tggcaactgc gacgtcgtga 4020
 tcggcattgt gaacaatac gtgtacgacc ctctgcagcc cgagctggac agcttcaaag 4080
 aggaactgga taagtactt aagaaccaca caagccccga cgtggacctg ggcgacatca 4140
 gcggaatcaa tgccagcgtc gtgaacatcc agaaagagat cgaccggctg aacgaggtg 4200
 ccaagaatct gaacgagagc ctgatcgacc tgcaagaact ggggaagtac gagcagtaca 4260
 tcaagtggc ctggtacatc tggtgggt ttatgccgg actgattgcc atcgtgatgg 4320
 tcacaatcat gctgtgtgc atgaccagct gctgtagct cctgaagggc tgtgtagct 4380
 gtggcagctg ctgcaagtc gacgaggac attctgagcc cgtgtcaaa ggagtcaat 4440
 tacattacac ataagatc cgatccacc gatctagata actgatcata atcagccata 4500
 ccacattgt agaggtttta ctgtcttaa aaaacctccc acacctccc ctgaacctga 4560
 aacataaaat gaatgcaatt gtgtgtgta actgtttat tgcagcttat aatggttaca 4620
 aataaagcaa tagcatcaca aattcaca ataaagcatt ttttactg cattctagt 4680
 gtggtttgtc caaactcatc aatgtatct 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 attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca 120
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180
ctttcattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgct 300
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
tagtcacgc tattaccatg gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttact ctccccatct 420
ccccccctcc caccaccaat ttgtattta tttattttt aattatttg tgcagcatg 480
ggggcggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcgggggc gggcgagggg cggggcgggg 540
cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gtcggaag tttctttta 600
tggcgagggc gcggcgggcg cgccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg 660
ctgcgcgtg ccttcgcccc gtgccccgt ccgccgcgc ctgcgcgcgc cggccccggc 720
tctgactgac cgcgttact ccacaggtga gcggggcgga cgcccttct cctccgggct 780
gtaattagcg ctgtgttaa tgacggcttg tttcttct gtggtgcgt gaaagcctg 840
aggggctccg ggagggccct ttgtcgggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg 900
tgtgcgtggg gagcgccgcg tgcggctccg cgtgcccgg cggtgtgag cgctgcgggc 960
gcggcgcggg gcttgtgcg ctccgcagtg tgcgcaggg gagcgcggcc gggggcggtg 1020
ccccggtg cgggggggct gcaggggaa caaaggctgc gtgcgggtg tgtcgtggg 1080
gggtgagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgaac cccccgtca cccccctcc 1140
cgagttgctg agcacggccc ggctcgggt gcggggctcc gtacggggcg tggcgggg 1200
ctgcgcgtc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc ggggccgct 1260
cgggcggggg agggctcggg ggagggggcg ggcggcccc ggagcgccg cggtgtcga 1320
ggcgcggcga gccgcagcca ttgccttta tgtaatcgt gcgagagggc gcagggactt 1380
ccttgcctc aaatctgtc ggagccgaaa tctggaggc gccgcgcac cccctctagc 1440
gggcgcgggg cgaagcgtg cggcgccgc aggaaggaaa tggcgggga gggcctcgt 1500
ggtgcgcgc gccgcgctc ccttctcct ctccagctc ggggctgtc gcgggggggac 1560
ggctgcctc ggggggacgg ggcagggcg ggtcggctt ctggcgtgtg accggcggt 1620
ctagaaagct tggtaacatg ttgtgttcc ttgtgtatt gccactagc tctagtcagt 1680
gtgtgaacct gaccacaaga accagctgc ctccagcta caccaacagc ttaccagag 1740
gcgtgtacta ccccgacaag gtgttcagat ccagcgtgct gactctacc caggacctgt 1800
tctgcctt ctccagcaac gtgacctgt tccagccat ccagtgctc ggcaccaatg 1860
gcaccaagag attcgacaac cccgtgctgc cctcaacga cggggtgtac ttgccagca 1920
ccgagaagtc caacatcatc agaggctgga tcttcggcac cacactggac agcaagacc 1980
agagcctgct gatcgtgaac aacgccacca acgtgtcat caaagtgtc gattccagt 2040
tctgaacga ccccttctg ggcgtctact atcacaaga caacaagagc tggatggaa 2100
gcgagttccg ggtgtacagc agcgccaaca actgcacct cgagtacgtg tccagcctt 2160
tctgatgga cctggaaggc aagcagggca actcaagaa cctgcgcgag ttcgtgtta 2220
agaacatcga cggtacttc aagatctaca gaaagcac ccctatcaac ctggtgcggg 2280
atctgctca gggcttctc gctctggaac cctggtgga tctgcccac ggcataaca 2340
tcaccgggt tcagacactg ctggccctgc acagaagcta cctgacacct ggcgatagca 2400
gcagcggatg gacagctggt gccgccgtt actatgtgg ctacctgcag cctagaacct 2460
tctgtctgaa gtacaacgag aacggcacca tcaccagcgc cgtggattgt gctctggatc 2520
ctctgagcga gacaaagtgc accctgaagt ccttaccgt ggaaaagggc atctaccaga 2580
ccagcaact cgggtgcag cccaccgaat ccatcgtgc gttcccaat ataccaatc 2640
tgtccccct cggcgagggt tcaatgcc cagattgc ctctgttac gcttgaacc 2700
ggaagcggat cagcaattgc gtggccgact actcgtgt gtacaactc gccagcttca 2760
gcacctcaa gtgtacggc gtgtccccta ccaagtga cgacctgtc ttacaaacg 2820
tgtacccga cagctcgt atccggggag atgaagtgc gcagattgcc cctggacaga 2880
caggcaagat cggcgactac aactacaagc tgcccgacga cttaccggc tgtgtgattg 2940
cctggaacag caacaacct gactccaaag tcggcgga ctacaattac ctgtaccggc 3000
tgttccgga gtccaatct aagccctc agcgggacat ctccaccgag atctaccag 3060

ccggcagcac cccttgaac ggctggaag gcttcaactg ctacttccca ctgcagtcct 3120
acggctttca gcccacaaat ggctgggct atcagcccta cagagtgggtg gtgctgagct 3180
tcgaactgct gcatgccct gccacagtgt gcggccctaa gaaaagcacc aatctctga 3240
agaacaaatg cgtgaacttc aactcaacg gcctgaccgg caccggcgtg ctgacagaga 3300
gcaacaagaa gtctctgcca ttccagcagt ttggccggga tattgccgat accacagacg 3360
ccgtacgaga tccccagaca ctggaaatcc tggacatcac cccttgacg ttggcgagg 3420
tgtctgtgat caccctggc accaacacca gcaatcaggt ggagtgctg taccaggacg 3480
tgaactgtac cgaagtgcct gtggccattc acgccgatca gctgacacct acatggcggg 3540
tgtactccac cggcagcaat gtgtttcaga ccagagccgg ctgtctgac ggagccgagc 3600
acgtgaacaa tagctacgag tgcgacatcc ccatcggcgc tggcatctgt gccagctacc 3660
agacacagac aaacagcccc agacgggcca gatctgtggc cagccagagc atcattgcct 3720
acacaatgtc tctgggcgcc gagaacagcg tggcctactc caacaactct atcgtatcc 3780
ccaccaactt caccatcagc gtgaccacag agatcctgcc tgtgtccatg accaagacca 3840
gcgtggactg caccatgtac atctgcggcg attccaccga gtgtccaac ctgctgctgc 3900
agtacggcag ctctgcacc cagctgaata gagccctgac agggatcgcc gtggaacagg 3960
acaagaacac ccaagaggtg ttgcccgaag tgaagcagat ctacaagacc cctcctatca 4020
aggacttcgg cggttcaat ttacgccaga ttctgcccga tctagcaag ccagcaagc 4080
ggagcttcat cgaggacctg ctgttcaaca aagtgcact ggccgacgcc ggcttcatca 4140
agcagtatgg cgattgtctg ggcgacattg ccgccaggga tctgatttc gccagaaat 4200
ttaacggact gacagtgtg ccaccactgc tgaccgatga gatgatcgcc cagtacacat 4260
ctgccctgt ggccggcaca atcacaagcg gctggacatt tggagctggc gccgctctgc 4320
agatccccct tgctatcgag atggcctacc ggttcaacgg catcgagtg acccagaatg 4380
tgtgtacga gaaccagaag ctgatcgcca accagttcaa cagcgccatc ggcaagatcc 4440
aggacagcct gagcagcaca gcaagcgccc tgggaaagct gcaggacgtg gtcaaccaga 4500
atgcccaggc actgaacacc ctggtcaagc agctgtctc caacttcggc gccatcagct 4560
ctgtgtgaa cgacatcctg agcagactgg acaaggtgga agccgaggtg cagatcgaca 4620
gactgatcac cggaaggctg cagtccctgc agacctacgt taccagcag ctgatcagag 4680
ccgccgagat tagagcctct gccaatctgg ccgccacca gatgtctgag tgtgtgctgg 4740
gccagagcaa gagagtggac ttttgcggca agggctacca cctgatgagc ttccctcagt 4800
ctgcccctca cggcgtgggtg ttctgcacg tgacatactg gccgctcaa gagaagaatt 4860
tcaccaccgc tcagccatc tggcagacg gcaaagccca ctctctaga gaaggcgtgt 4920
tcgtgtccaa cggcacccat tggttcgtga ccagcggaa ctctacgag cccagatca 4980
tcaccaccga caacacctc gtgtctggca actgcgacgt cgtgatcggc attgtgaaca 5040
atacgtgtga cgacctctg cagcccgagc tggacagctt caaagaggaa ctggataagt 5100
actttaagaa ccacacaagc cccgacgtgg acctgggcca catcagcgga atcaatgcca 5160
gcgtcgtgaa catccagaaa gagatcgacc ggctgaacga ggtggccaag aatctgaacg 5220
agagcctgat cgacctgcaa gaactgggga agtacgagca gtacatcaag tggccctggt 5280
acatctggct gggctttatc gccggactga ttgccatct gatggtcaca atcatgctgt 5340
gttgcacgac cagctgctgt agctgcctga agggctgttg tagctgtggc agctgctgca 5400
agttcgacga ggacgattct gagcccgtgc tcaaaggagt caaattacat tacacataat 5460
tcactctca ggtgcaggct gcctatcaga aggtgtggc tgggtggcc aatgccttg 5520
ctcacaata cactgagat cttttccct ctgcaaaaaa ttatggggac atcatgaagc 5580
cccttagca tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat ttctattgca atagtgtgt 5640
ggaattttt gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat taaaacatc 5700
agaatgagta ttggtttag agtttgcaa catatgcca tatgtggtt gccatgaaca 5760
aaggttggt ataaagaggt catcagtata tgaacagcc cctgctgtc cattccttat 5820
tccatagaaa agccttgact tgaggtaga ttttttata tttgtttg tttttttt 5880
tcttaacat cctaaaatt ttcttacct gtttactag ccagatttt cctcctctcc 5940
tgactactcc cagtcacagc tgtccctct ctcttatgga gatc 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 cgggtcccggt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgggt cctagagaag gtggcgcgagg gtaaacctggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt tccccagggt tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cggcgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tgggtccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cactggctg cagtacgtga ttctgatcc cgagcttcgg gtggaagtg 360
ggtgggagag ttcaggcct tgcgttaag gagcccttc gcctcgtgt tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgtggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctta gccattaaa attttgatg acctgctgcg acgcttttt 540
tctggcaaga tagtcttga aatcggggc aagatctgca cactggtatt tgggttttg 600
ggggcgcgagg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcgacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgccctggcct cgcgccgccc tgcctgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggctcg 780
caccagttgc gtgagcgga agatggccgc tccccggccc tgctgcaggg agtcaaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900
ttccgtctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc 960
tcgattagtt ctgcagctt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcactga 1080
tgaattctc ctggaattt gcccttttg agttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
agacagtgt tcaaagttt ttcttccat ttcaggtgc gtgaggaatt agcttggtac 1200
taatacgact cacaagctg gtaccatgtt tgtgttcct gtgtattgc cactagtctc 1260
tagtcagtgt gtgaacctga ccacaagaac ccagctgcct ccagcctaca ccaacagctt 1320
taccagagcg gtgtactacc ccgacaaggt gttcagatcc agcgtgctgc actctacca 1380
ggacctgttc ctgcctttt tcagcaacgt gacctgggtc caccgcatcc acgtgtccgg 1440
caccaatggc accaagagat tcgacaacc cgtgtgccc ttcaacgac ggggtgactt 1500
tgccagcacc gagaagtcca acatcatcag aggtggatc ttggcacca cactggacag 1560
caagaccag agcctgctga tcgtgaacaa cgccaccaac gtggtcatca aagtgtgcga 1620
gttccagttc tgcaacgacc cttctctggg cgtctactat cacaagaaca acaagagctg 1680
gatggaaagc gaggtcggg gtacacgag cgccaacaac tgcacctcg agtacgtgc 1740
ccagccttc ctgatggacc tggaaggcaa gcagggaac ttcaagaacc tgcgcgagtt 1800
cgtgttcaag aacatcgacg gctacttcaa gatctacagc aagcacacc ctatcaacct 1860
cgtgcgggat ctgcctcagg gcttctctgc tctggaacc ctggtggatc tgccatcgg 1920
catcaacatc acccggttc agacactgt gccctgcac agaagctacc tgacacctgg 1980
cgatagcagc agcggtgga cagctggtgc cgccgttac tatgtgggt acctgcagcc 2040
tagaaccttc ctgctgaagt acaacgaga cgccaccatc accgacgccc tggattgtgc 2100
tctggatcct ctgagcgaga caaagtgcac cctgaagtcc ttaccgtgg aaaaggcat 2160
ctaccagacc agcaacttc ggggtgcagc caccgaatcc atcgtgcggt tcccaatat 2220
caccaatctg tgccttcg gcgaggtgt caatgccacc agattgcct ctgtgtacgc 2280
ctggaaccgg aagcggtat gcaattgcgt ggccgactac tccgtgctgt acaactccgc 2340
cagcttcagc accttcaagt gctacggcgt gtccctacc aagctgaac acctgtgctt 2400
cacaacgtg tacgccgaca gttctgtgat cgggggagat gaagtgcggc agattgccc 2460
tggaacagca ggcaagatc cgactacaa ctacaagctg ccgacgact tcaccggctg 2520
tgtgattgcc tggaacagca acaacctgga ctccaaagtc ggcggaact acaattacct 2580
gtaccggctg ttcggaagt ccaatctgaa gcccttcgag cgggacatct ccaccagat 2640
ctatcaggcc ggcagaccc ctgtaacgg cgtggaaggc tcaactgt acttccact 2700
gcagctctac ggcttcagc ccacaaatgg cgtgggctat cagccctaca gagggtggt 2760
gctgagcttc gaactgctgc atgccctgc cacagtgtgc ggccctaaga aaagcaccia 2820

tctcgtgaag aacaaatgcg tgaacttcaa cttaacggc ctgaccggca ccggcgtgct 2880
gacagagagc aacaagaagt tctgccatt ccagcagttt ggccgggata ttgccgatac 2940
cacagacgcc gtacgagatc ccagacact ggaaatcctg gacatcaccc cttgcagctt 3000
cgggcggagtg tctgtgatca cccctggcac caacaccagc aatcaggtgg cagtgtgtga 3060
ccaggacgtg aactgtaccg aagtgcccg ggccattcac gccgatcagc tgacacctac 3120
atggcgggtg tactccaccg gcagcaatgt gtttcagacc agagccggct gtctgatcgg 3180
agccgagcac gtgaacaata gctacgagtg cgacatcccc atcggcgctg gcatctgtgc 3240
cagctaccag acacagacaa acagccccag acggggcaga tctgtggcca gccagagcat 3300
cattgcctac acaatgtctc tgggcgccga gaacagcgtg gcctactcca acaactctat 3360
cgctatcccc accaacttca ccatcagcgt gaccacagag atcctgcctg tgtccatgac 3420
caagaccagc gtggactgca ccatgtacat ctgcggcgat tccaccgagt gctccaacct 3480
gctgctgcag tacggcagct tctgcaccca gctgaataga gccctgacag ggatcgccgt 3540
ggaacaggac aagaacaccc aagaggtgtt cgcccaagtg aagcagatct acaagacccc 3600
tctatcaag gacttcggcg gctcaattt cagccagatt ctgcccgatc ctagcaagcc 3660
cagcaagcgg agcttcacg aggacctgct gttcaacaaa gtgacactgg ccgacgccgg 3720
cttcatcaag cagtatggcg attgtctggg cgacattgcc gccagggatc tgatttgcgc 3780
ccagaagttt aacggactga cagtgtgcc accactgctg accgatgaga tgatcgccca 3840
gtacacatct gccctgtgg ccggcacaat cacaagcggc tggacattg gagctggcgc 3900
cgctctgcag atcccccttg ctatgcagat ggcctaccgg ttcaacggca tcggagtgc 3960
ccagaatgtg ctgtacgaga accagaagct gatcgccaac cagttaaca gcgccatcgg 4020
caagatccag gacagcctga gcagcacagc aagcgccctg ggaaagctgc aggacgtggt 4080
caaccagaat gcccaggcac tgaacacct ggtcaagcag ctgtctcca acttcggcgc 4140
catcagctct gtgtgaacg acatcctgag cagactggac aaggtggaag ccgaggtgca 4200
gatcgacaga ctgatcccg gaaggctgca gtcctgcag acctacgtta cccagcagct 4260
gatcagagcc gccgagatta gagcctctgc caatctggcc gccaccaaga tgtctgagt 4320
tgtgtgggc cagagcaaga gactggactt ttgcggcaag ggctaccacc tgatgagctt 4380
ccctcagct gccctcacg gcgtggtgtt tctgcacgtg acatactgc ccgtcaaga 4440
gaagaatttc accaccgtc cagccatctg ccacgacggc aaagccact ttctagaga 4500
aggcgtgttc gtgtccaacg gcacccattg gttcgtgacc cagcggaaact tctacgagcc 4560
ccagatcac accaccgaca acacctctgt gctggcaac tgcgacgtc tgatcgcat 4620
tgtgaacaat accgtgtacg acctctgca gcccgagctg gacagcttca aagaggaact 4680
ggataagtac ttaagaacc acacaagccc cgacgtggac ctgggcgaca tcagcggaa 4740
caatgccagc gtcgtgaaca tccagaaaga gatcgaccgg ctgaacgagg tggccaagaa 4800
tctgaacgag agcctgatc acctgcaaga actggggaag tacgagcagt acatcaagt 4860
gccctgtac atctggctgg gctttatgc cgactgatt gccatcgtga tggtcacaat 4920
catgtgtgt tgcatgacca gctgtgtg ctgcctgaag ggctgtgtg gctgtggcag 4980
ctgtgcaag ttcgacgagg acgattctga gccctgtc aaaggagtca aattacatta 5040
cacataagat ctagagtcgg ggcggccggc cgctcgtga tcagcctga ctgtgcctc 5100
tagttgccag ccatctgtt ttgcccctc ccccgctc tcttgacc tggaaggtgc 5160
cactccact gtccttct aataaaatga ggaaattgca tcgcatgtc tgagtaggtg 5220
tcattctatt ctgggggggt gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa 5280
tagcaggcat 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 attacggggg cattagtcca tagcccatat atggagtcc gcgttacata 60
acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 120

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttfc cattgacgtc aatgggtgga 180
gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tcatatgc caagtacgcc 240
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagt acatgacctt 300
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat 360
gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggtt gactcacggg gattccaag 420
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaatcaac gggactttcc 480
aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 540
ggtctatata agcagagctg gtttagtgaa ccgtcagatc cgctagagat ctggtacct 600
gtttgtgtc ctgtgttat tgccactagt ctctagtcag tgtgtgaacc tgaccacaag 660
aaccagctg cctccagcct acaccaacag cttaccaga ggcgtgtact accccgacaa 720
ggtgttcaga tccagcgtgc tgcactctac ccaggacctg ttctgcctt tcttcagcaa 780
cgtgacctgg ttccagcca tccacgtgc cggaccaat ggcaccaaga gattcgacaa 840
ccccgtgctg ccttcaacg acggggtgta ctttgcagc accgagaagt ccaacatcat 900
cagaggtggt atcttcggca ccactgga cagcaagacc cagagcctgc tgatcgtgaa 960
caacgccacc aacgtggtca tcaaagtgtg cgagtccag ttctgaacg acccttct 1020
gggctctac tatcacaaga acaacaagag ctggatggaa agcgagtcc ggggttacag 1080
cagcgccaac aactgcacct tcgagtacgt gtccagcct ttctgatgg acctggaagg 1140
caagcagggc aactcaaga acctgcgca gttcgtgtc aagaacatcg acggctactt 1200
caagatctac agcaagcaca ccctatcaa cctcgtgcgg gatctgcctc agggcttctc 1260
tgctctggaa ccctggtggt atctgccc atcgcatcaac ataccegggt ttcagacact 1320
gctggccctg cacagaagct acctgacacc tggcgatagc agcagcggat ggacagctgg 1380
tgccgccgt tactatgtgg gctacctga gctagaacc ttctgtga agtacaacga 1440
gaacggcacc ataccgacg ccgtggattg tgctctggat cctctgagcg agacaaagt 1500
caccctgaag tcttcaccg tggaaaagg catctaccag accagcaact tccgggtgca 1560
gccaccgaa tcatcgtgc ggttcccaa tatccaat ctgtgccct tggcgaggt 1620
gttcaatgcc accagattcg cctctgtgta cgcctggaac cggaaagcga tcagcaattg 1680
cgtggccgac tactcgtgc tgtacaactc cgccagcttc agcaccttca agtgctacgg 1740
cgtgtccct accaagctga acgacctgt cttcacaac gtgtacgcc acagcttctg 1800
gatccgggga gatgaagtgc ggcagattgc cctggacag acaggcaaga tcgccgacta 1860
caactacaag ctgcccagc acttcaccgg ctgtgtgatt gctggaaca gcaaacct 1920
ggactccaaa gtggcgga actacaatta cctgtaccgg ctgttcgga agtccaatct 1980
gaagcccttc gagcgggaca tctccaccga gatctatcag gccggcagca cccctgtaa 2040
cggcgtggaa ggcttcaact gctacttccc actgcagtcc tacggcttcc agccacaaa 2100
tggcgtgggc tatcagccct acagagtgt ggtgctgagc ttgaactgc tgcagcccc 2160
tgccacagtg tggcgcccta agaaaagcac caatctcgtg aagaacaaat gctgaactt 2220
caacttcaac ggctgaccg gcaccggcgt gctgacagag agcaacaaga agttcctgcc 2280
attccagcag ttggccggg atattgccga taccacagac gccgtacgag atccccagac 2340
actggaaatc ctggacatca cccctgcag cttggcgga gtgtctgtga tcaccttg 2400
caccaacacc agcaatcagg tggcagtgt gtaccaggac gtgaactgta ccgaagtgcc 2460
cgtggccatt cagccgac agctgacacc tacatggcgg gtgtactcca ccggcagcaa 2520
tgtgttcag accagagccg gctgtctgat cggagccgag cacgtgaaca atagctacga 2580
gtgcgacatc ccatcgggc ctggcatctg tgccagctac cagacacaga caaacagccc 2640
cagacgggcc agatctgtgg ccagccagag catattgcc tacacaatgt ctctgggcgc 2700
cgagaacage gtggcctact ccaacaactc tategtatc cccaccaact tcaccatcag 2760
cgtgaccaca gagatctgc ctgttccat gaccaagacc agcgtggact gcaccatgta 2820
catctgcggc gattccaccg agtgctcaa cctgtctgt cagtacggca gtttctgcac 2880
ccagctgaat agagccctga caggatcgc cgtggaacag gacaagaaca cccaagaggt 2940
gttcgcccga gtgaagcaga tctacaagac cctcctatc aaggacttcg gcggcttcaa 3000
tttcagccag atttgcctg atctagcaa gccagcaag cggagcttca tcgaggacct 3060
gctgttcaac aaagtacac tggccgacgc cggttcac aagcagtatg gcgattgtct 3120
gggcgacatt gccgccagg atctgattg cggccagaag ttaacggac tgacagtgt 3180
gccaccactg ctgaccgatg agatgatcgc ccagtacaca tctgccctgc tggccggcac 3240

aatcacaagc ggctggacat ttggagctgg cgccgctctg cagatcccct ttgctatgca 3300
gatggcctac cgggttaacg gcatcgagtg gaccagaat gtgtgttacg agaaccagaa 3360
gctgatgcc aaccagtta acagcgccat cggcaagatc caggacagcc tgagcagcac 3420
agcaagcggc ctgggaaagc tgcaggacgt ggtaaccag aatgccagg cactgaacac 3480
cctggtaag cagctgtcct ccaactcgg cgccatcagc tctgtgtga acgacatcct 3540
gagcagactg gacaaggtgg aagccgaggt gcagatcgac agactgatca ccggaaggct 3600
gcagtcctg cagacctacg ttaccagca gctgatcaga gccgccgaga ttaggcctc 3660
tgccaatctg gccgccacca agatgtctga gtgtgtgtg ggccagagca agagagtga 3720
cttttgcggc aagggtacc acctgatgag ctccctcag tctgcccctc acggcgtggt 3780
gtttctgcac gtgacatacg tgcccgtca agagaagaat ttaccaccg ctccagccat 3840
ctgccacgac ggcaaagccc actttcctag agaaggcgtg ttcgtgtcca acggcaccca 3900
ttggttcgtg acccagcgga actttacga gccccagatc ataccaccg acaacacctt 3960
cgtgtctggc aactgcgacg tctgatcgg cattgtgaac aataccgtgt acgacctct 4020
gcagcccagc ctggacagct tcaaagagga actggataag tactttaaga accacacaag 4080
ccccgacgtg gacctgggcg acatcagcgg aatcaatgcc agcgtcgtga acatccagaa 4140
agagatcgac cggctgaacg aggtggccaa gaatctgaac gagagcctga tcgacctgca 4200
agaactgggg aagtacgagc agtatcatca gtggccctgg tacatctggc tgggctttat 4260
cgccggactg attgccatcg tgatgtcac aatcatgctg ttttgcata ccagctgctg 4320
tagctgctg aagggtctgt gtatgtgtg cagctgctgc aagtctgacg aggacgattc 4380
tgagcccgtg ctcaaaggag tcaaattaca ttacacataa gatatcgcg ccgctcgagt 4440
ctagataact gatcataat agccatacca cattgtaga ggttttactt gctttaaaaa 4500
acctccaca cctcccctg aacctgaaac ataaatgaa tgcaattgtt gttgttaact 4560
tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttacaaata 4620
aagcattttt ttactgcat tctagtgtg gttgtccaa actcatcaat gtatctta 4678

<210> 5

<211> 33765

<212> DNA

<213> Recombinant human adenovirus serotype 26

<220>

<223> Материнская последовательность рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, а ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5

<400> 5

catcatcaat aatatacccc acaagtaaa caaaagttaa tatgcaaatg agcttttgaa 60
tttaacggt ttggggcg agccaacgt gattggacga gaaacggtga tgcaaatgac 120
gtcacgacgc acggctaacg gtcgccgagg aggcgtggcc tagcccgga gcaagtcgag 180
gggctgatga cgtataaaaa agcggacttt agaccggaa acggccgatt tccccgagc 240
cacgcccgga tatgaggtaa ttctgggagg atgcaagtga aattaggtca tttggcgag 300
aaaactgaat gaggaagtga aaagcgaaaa ataccggtcc ctcccagggc ggaatatta 360
ccgaggggag agagacttt accgattacg tgggggtttc gattgcggtg ttttttcgc 420
gaatttcgc gtcctgtca aagtccggtg ttatgtcac agatcagctg gtttcctta 480
agatacattg atgagtttg acaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 540
tgtgaaattt gtgatgctat tgctttatt gtaaccatta taagtgtcaa taaacaagt 600
aacaacaaca attgcattca tttatgtt caggttcagg gggaggtgtg ggaggtttt 660
taaagcaagt aaaacctta caaatgtgt atggctgatt atgatcagtt atctagatcc 720
ggtggatcgg atatcttat tgtaatgtaa ttgactcct ttgagcacgg gtcagaatc 780
gtcctcgtcg aacttcgac agtgcacaca gctacaacag ccttcaggc agctacagca 840
gctgtcatg caacacagca tgattgtgac catcacgatg gcaatcagtc cggcgataaa 900
gccagccag atgtaccagg gccactgat gtactgtcg tacttccca gttcttcag 960
gtcgtacagg ctctcgtca gattcttggc cactcgttc agccggtcga tctcttctg 1020
gatgttcag acgtggcat tgattcgtg gatgtcgcc aggtccacgt cggggcttgt 1080
gtggttctta aagtacttat ccagttctc ttgaagctg tccagctcgg gctgcagagg 1140
gtcgtacag gtattgtca caatgccgat cagcagtcg cagttgccag acacgaagg 1200

gtgtcgggtg gtgatgatct ggggctcgta gaagttccgc tgggtcacga accaatgggt 1260
gccgttggac acgaacacgc ctctctagg aaagtgggt ttgccgtct ggcagatggc 1320
tggagcgggtg gtgaaattct tctcttagc gggcacgtat gtcacgtgca gaaacaccac 1380
gccgtgaggg gcagactgag ggaagctcat caggtggtag ccctggccgc aaaagtccac 1440
tctctgtc tggcccagca cacactcaga catcttgggt gcggccagat tggcagaggg 1500
tctaattctg gcggctctga tcagctgctg ggtaacgtag gtctgcaggg actgcagcct 1560
tccggtgatc agtctgtcga tctgcacctc ggcttccacc ttgtccagtc tgetcaggat 1620
gtcgttcagc acagagctga tggcgccgaa gttggaggac agctgcttga ccagggtgtt 1680
cagtgcctgg gcattctggt tgaccacgtc ctgcagcttt cccaggggcg ttgtgtgt 1740
gtcaggtctg tcttgatct tggcgatggc gctgttgaac tggttggcga tcagcttctg 1800
gttctcttac agcacattct gggctactcc gatgccgtt aaccggtagg ccatctgcat 1860
agcaaagggg atctgcagag cggcgccagc tccaaatgtc cagccgctt tgattgtgc 1920
ggccagcagg gcagatgtgt actggcgat catctcatc gtcagcagtg gtggcagcac 1980
tgtcagtcg ttaaacttct gggcgcaaat cagatccctg gcggcaatgt cggccagaca 2040
atcgccatac tgcttgatga agccggcgtc ggccagtgtc acttgttga acagcaggtc 2100
ctcgtagaag ctccgcttgc tgggcttct aggatcgggc agaactctgc tgaattgaa 2160
gccgccgaag tcttgatag gaggggtctt gtagatctgc ttacttggg cgaacacctc 2220
ttgggtgtc ttgtctgtt ccacggcgat ccctgtcagg gctctattca gctgggtgca 2280
gaagctgccg tactgcagca gcaggttga gcaactcggg gaatcgccgc agatgtacat 2340
ggtgcagtc acgtgtgtct tggcatgga cacaggcagg atctctgtg tcacgtgat 2400
ggtgaagttg gtgggtag ctagaggtt gttggagtag gccacgtgt tctcgccgc 2460
cagagacatt gttaggcaa tgatgctct gctggccaca gatctggccc gtctggggct 2520
gttgtctgt gcttgtagc tggcacagat gccagcgccg atggggatgt cgcactcgta 2580
gctattgtc acgtgtcgg ctccgatcag acagccggct ctggtctgaa acacattgct 2640
gccggtggag tacacccgc atgtaggtgt cagctgatc gcgtgaatgg ccacgggcac 2700
ttcggtacag ttacgtct ggtacagcac tggcacctga ttgtggtgt tggtgccagg 2760
ggtgatcaca gacactccgc cgaagctgca aggggtgatg tccaggattt ccagtgtctg 2820
gggatctct acggcgtctg tggatcggc aatatcccg ccaaactgct ggaatggcag 2880
gaacttctt ttgtctctg tcagcacgcc ggtgccggtc aggccgttga agttgaagt 2940
cacgcattt ttctcacga gattggtgt ttcttaggg ccgcacactg tggcaggggc 3000
atgcagcagt tcgaagctca gcaccaccac tctgtagggc tgatagcca cgccattgt 3060
gggctgaaag ccgtaggact gcagtgggaa gtagcagttg aagccttcca cgccgttaca 3120
aggggtgctg ccggcctgat agatctcggg ggagatgtcc cgctcgaagg gcttcagatt 3180
ggacttccg aacagccgt acagtaatt gtagttgcc cgcacttgg agtccaggt 3240
gttctgttc caggcaatca cacagccgtt gaagtcgtc ggcagctgt agttgtagc 3300
ggcgtctt cctgtctgtc caggggcaat ctgccgact tcatctccc ggtacacgaa 3360
gctgtcggc tacagttt tgaagcacag gtcgttcagc ttggtaggg acacgccgta 3420
gcacttgaag gtgtgaagc tggcggagt gtacagcac gagtagtcg ccacgcaatt 3480
gctgatccg ttcgggttc aggcgtacac agaggcgaat ctggtggcat tgaacacctc 3540
gccgaaggg cacagattg tgatattgg gaaccgcag atggattcg tgggtgcac 3600
ccggaagttg ctggtctgt agatgccct ttccacggtg aaggacttca ggtgcactt 3660
tgtctcgtc agaggatcca gagcacaatc cacggcgtc gtgatgtgtc cgttctcgtt 3720
gtacttcagc aggaagggtc taggctgcag gtagccaca tagtaagcgg cggcaccagc 3780
tgccatccg ctgctgtat cgccaggtgt caggtagctt ctgtcaggg ccagcagtg 3840
ctgaaaccg gtgatgttga tggcgatggg cagatccacc aggggttcca gagcagagaa 3900
gccctgagc agatcccga cgaggtgat aggggtgtg ttgtgtaga tctgaagta 3960
gccgtgatg ttctgaaca cgaactcgc caggttctt aagttgccct gcttgcctc 4020
caggtccatc aggaaggtt gggacacgta ctgaaaggtg cagttgttgg cgctgtgtg 4080
caccggaac tcgcttcca tccagctct gttgttctt ttagtaga cgccaggaa 4140
ggggtcgtt cagaactgga actcgcacac ttgatgacc acgttggtg cgttgtcac 4200
gatcagcagg ctctgggtct tctgtccag tgtgtgccg aagatccagc ctctgatgat 4260
gttggtctc tgggtctgg caaagtacac ccgtcgtt aagggcagca cggggttgc 4320

gaatctcttg gtgccattgg tgccggacac gtggatggcg tggaaccagg tcacgttgct 4380
gaagaaaggc aggaacaggt cctgggtaga gtgcagcagc ctggatctga acacctgtc 4440
ggggtagtac acgcctctgg taaagctgtt ggtgtaggct ggaggcagct gggttcttgt 4500
ggtcaggttc acacactgac tagagactag tggcaataac acaaggaaca caaacatggt 4560
accaagctta ggctcgagcg gccgcgtcga cggtagcaga tctctagcgg atctgacggt 4620
tactaaacc agctctgctt atatagacct cccaccgtac acgcctaccg cccatttgcg 4680
tcaatggggc ggagttgta cgacattttg gaaagtcccg ttgattttgg tgccaaaaca 4740
aactccatt gacgtcaatg ggggtggagac ttggaaatcc ccgtgagta aaccgctatc 4800
cacgcccatt gatgtactgc caaaaccgca tcaccatggt aatagcgatg actaatacgt 4860
agatgtactg ccaagtagga aagtccata aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg 4920
gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac acttgatgta 4980
ctgccaaagt ggcagtttac cgtaaatact ccaccattg acgtcaatgg aaagtccta 5040
ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttggcg 5100
gtcagccagg cgggccatt accgtaagt atgtaacgcg gaactccata tatgggctat 5160
gaactaatga cccgtaatt gattactatt aacagtgtt aaactatac ctataaaggc 5220
gggtgtctta cgagggtctt tttgctttc tgcagacatc atgaacggga ctggcggggc 5280
cttgaaggg gggctttta gcccttatt gacaaccgc ctgccgggat gggccggagt 5340
tcgtcagaat gtgatgggat cgacgggtga tgggcgcca gtgtccag caaattctc 5400
gacctgacc tacgcgaccg tggggaactc gtcgtcgac agcaccgcc cagccgcgcg 5460
agccgcagcc gccatgacag cgacgagact ggcctcgac tacatgcca gcagcggtag 5520
tagccctct gtgccagtt ccatcatgc cgaggagaaa ctgtggccc tctggccga 5580
gctggaagcc ctgagccgc agctggccg cctgaccag caggtgtccg agtccgcga 5640
acagcagcag cagcaaaata aatgattcaa taaacacaga ttctgattca aacagcaaag 5700
catcttatt attatttt tcgcgcgagg taggcccgtg tccactctc ccgatcattg 5760
agagtgcgtt ggatttttc caggaccgg tagaggtggg attggatgtt gaggtacatg 5820
ggcatgagcc cgtcccgtg gtggaggtag caccactgca tggcctctg ctctggggtc 5880
gtgtttaga tgatccagtc atagcagggg cgctgggctt ggtgtggat gatgtcctg 5940
aggaggagac tgatggccac ggggagcccc ttgtgtagg tttggcaaa acggttgagc 6000
tgggagggat gcatgcgggg ggagatgatg tgcagtttg cctggatctt gaggttggcg 6060
atgttccac ccagatccc cggggggtc atgttgtca ggaccaccag aacggttag 6120
cccgtgact tggggaactt gtcatgcaac ttggaaggga atgcgtggaa gaatttgag 6180
acgccctgt gccgcccag gtttccatg cactcatcca tgatgatggc aatgggcccg 6240
tgggtgcgg ctttggcaaa gacgtttctg ggtcagaga catcgtat atgctcctg 6300
gtgagatcat cataagacat ttaataat ttggggcgga ggtgccaga ttgggggacg 6360
atggttccct cgggccccg ggcaagttc cctcgcaga tctcatctc ccaggcttc 6420
atctcggagg gggggatcat gtccactgc ggggcgatga aaaaaacggt ttccggggcg 6480
ggggtgatga gtcgcagga gacaggtt ctcaacagct gggacttgc gcaccggtc 6540
gggcgtaga tgacccgat gacgggtgc aggtgtagt tcaaggacat gcagtgccg 6600
tcgtcccga ggaggggggc cactcgtt agctgtctc tgacttgag gtttcccg 6660
acgagctgc cgaggaggcg gtccccgc agcgagagaa gctctgcag ggaagcaaag 6720
ttttcagg gcttagccc gtcggccatg ggcatttgg cgagggtctg cgagaggagc 6780
tccaggcgtt ccagagctc ggtgacgtc tctacggcat ctcgatccag cagacttct 6840
cgttcgggg gttgggacga ctgcactgt agggcacgag acgatggcg tccagcgcg 6900
ccagctcat gtcctccag ggtcaggg tccgctgag ggtgtctc gtcacggtga 6960
aggggtggg cgcggttgg gcgttgcaa ggtgcgctt gagactcct ctgtgtgc 7020
tgaaacgggc acggtctc cctgcgcgt cgcgagata gcagtgacc atgagctct 7080
agttgaggg ctcggggcg tggcccttgc cgcgagctt gcccttgaa gagcgcccgc 7140
aggcgggaca gaggaggat tgcagggcgt agagcttgg cgcgagaaag acggactcg 7200
ggcggaaggc gtccgtccg cagtgggcgc agacggtct gcactcgact agccaggtga 7260
gtcgggctg ctcggggtca aaaaccagt tccccgtt cttttgatg cgttcttac 7320
ctcgcgtc catgagctg tgcgcgct cggtgacaaa caggtgtct gtgtcccgt 7380
agacggactt gatgggcctg tctgcaggg gcgtcccgc gtcctctc tagagaaact 7440

cagaccactc tgagacgaag gcgcgcgtcc acgccaagac aaaggaggcc acgtgcgagg 7500
ggtagcggtc gttgccacc aggggggtcca cttttccac ggtatgcagg cacatgtccc 7560
cctctccgc atccaagaag gtgattggct ttaggtgta ggccacgtga cctgggggtc 7620
ccgacggggg ggtataaaag ggggcgggtc tgtgctcgtc ctcactctc tccgctcgc 7680
tgtccacgag cgcagctgt tgggtaggt attccctctc aagagcgggc atgacctcg 7740
cactcaggtt gtcagttct agaaacgagg aggattgat gtgggcctgc cctgccgca 7800
tgttttag gagacttca tccatctgt cagaaaagac ttttttta ttgtcaagct 7860
tggtggcgaa ggagccatag agggcggtt agagaagctt ggcgatggat ctcagtgtct 7920
gattttgtc acggtcggcg cgctccttgg ccgcgatgt gagctggaca tattcgcgcg 7980
cgacacactt ccattcgggg aagacgggtg tgcgtcgtc gggcacgac ctagcgcgc 8040
agccgcggtt atgcagggtg accagggtcca cgctggtggc cacctcgccg cgcaggggct 8100
cgttggtcca gcagagtctg ccgcccttgc gcgagcagaa cgggggcagc acatcaagca 8160
gatgctcgtc aggggggtcc gcatcgatgg tgaagatgcc cggacagagt tcctgtcaa 8220
aataatcgt ttttaggat gcatcgcca aggccatctg ccactcgcg gcggccagcg 8280
ctcgtcgtg ggggttagg ggcggacccc aaggcatggg atcggtagg gcggaggcgt 8340
acatgccgca gatgcatag acatagatgg gctccgagag gatgccgat taggtgggat 8400
agcagcgcgc ccgcgggatg cttgcgcgca cgtagcata caactcgtc gagggggcca 8460
agaaggcggg gccgagattg gtgcgtggg gctgctcggc gcggaagacg atctggcgaa 8520
agatggcgtg cgagttggag gagatggtgg gccgttgaa gatgttaaag tgggcgtgag 8580
gcaggcggac cgagtcggcg atgaagtgcg cgtaggagtc ttgcagctt gcgacgagct 8640
cggcggtgac gaggacgtc atggcgcagt agtcagcgt ttcgcggatg atgtcataac 8700
tcgctctcc tttctctcc cacagctcgc ggttagggc gtattcctc tcactctcc 8760
agtactccc gagcgggaat cctcgatct ccgcacggta agagcccagc attagaaat 8820
ggtcacggc ctgtaggga cagcagccct tctccacggg gagggcgtaa gcttagcgg 8880
ccttgccgag cgaggtgtg gtcagggcaa aggtgtccct gacctgact tcaagaact 8940
ggtactgaa gtccgagtcg tcgcagccgc cgtgctcca gagctcgaat tcggtgcgt 9000
tcttcgagag ggggttaggc agagcgaaag tgacgtcatt gaagagaatc ttgctgcc 9060
gcggcatgaa attgcgggtg atgcggaaag ggcccgggac ggaggtcgg ttgtgatga 9120
cctgggcggc gaggacgac tcgtcaaaag cgttgatgt gtgcccagc atgtagagt 9180
ccatgaatc cgggcgccct ttgatgtgc gcagctttt gagctcctc taggtgagt 9240
cctcggggca ttgcaggccg tctgctcga gcgccactc ctggagatgt gggttggtt 9300
gcatgaagga agcccagagc tcgcgggcca tgagggtctg gagctcgtc cgaaagaggc 9360
ggaactgct gccacggcc atctttctg ggtgacgca gtagaaggt aggggggtcc 9420
gtccacagc atccagcgt aaacgcacgg cgagatcgc agcgaggcg accagctctg 9480
ggtccccga gaattcatg accagcatga aggggacgag ctgcttgccg aaggaccca 9540
tccaggtga gtttctaca tcgtaggta caaagagccg ctccgtcga ggatgagagc 9600
cgattggaa gaactggatt tctgccacc agttggacga gtggtgtt atgtatgaa 9660
agtagaaat ccgccggca accgagcact cgtgctgat cttgaaaag cgtccgagt 9720
actcgagcg ctgcacgggc tgcacctat ccacgagata cacagcgcgt ccctgagga 9780
ggaactcag gattggcggc cctggctggt ggtttcatg ttcgctcgc tgggactcac 9840
cctggggctc ctcaggagc gagaggctga cgagcccgcg cgggagccag gtccagatct 9900
cggcgcgcg ggggcggaga gcgaagacga gggcgcgag ttgggagctg tccatggtg 9960
cgcgagatc cagggtccgg ggcagggtt tgaggtgac ctcgtagagg cgggtgagg 10020
cgtgcttag atgcagatg tactgtatt ctacgggtga gttggtgtc gtgtccacg 10080
attgcatgag cccgtagct gcgcggggcca cgaccgtgc gcggtgcgt ttagaagcg 10140
gtgctcgga cgcgtcccg gcggcagcg cggttcggc ccgcgggca gggcgggcag 10200
aggcacgtc gcgtggcgt cgggcaggtc ccgtgctgc gccctgagag cgtggcgtg 10260
cgcgacgac cggcgggtga catctggat ctccgcctc tgcgtgaaga ccacgggccc 10320
cgtgacttg aacctgaaag acagttaac agaataatc tctgctcat tgacggcggc 10380
ctgacgagg atctcttga cgtcggcga gttgcttg tagcgatct cggacatgaa 10440
ctgtcgtc tctctctc ggagatgcc gcggcccg cgctccacgg tggcgcgag 10500
gtcattggag atgcgacca tgagctgca gaaggcggc agccgctct cgtccagac 10560

gcggctgtag accacgtccc cgtcggcgtc gcgcgcgcgc atgaccacct gcgcgaggtt 10620
gagctccacg tgcgcgcaa agacggcgta gttgcgcagg cgctggaaga gtagttgag 10680
ggtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa gtacatgac cagcggcgca ggggcatctc 10740
gctgatgtcg ccgatggctt ccagccttcc catggcctcg tagaagtcca cggcgaagtt 10800
gaaaaactgg gcgttgccgg ccgagaccgt gagctcgtct tccaggagcc gtagagttc 10860
ggcgtgggtg gcgcgcacct cgcgctcgaa atccccgggg gcctcctct cttctcttc 10920
ttccatgacg acctcttctt ctatttctt ctttgggggc ggtggtggtg gcggggggccg 10980
acgacgacgg cgacgcaccg ggagacggtc gacgaagcgc tcgatcatct cccgcggcg 11040
gcgacgcatg gtttcggtga cggcgcgacc ccgttcgca ggacgcagcg tgaagacgcc 11100
gccggtcatc tcccggtaat ggggcgggtc ccattgggc agcgataggg cgctgacgat 11160
gcattttatc aattgcggtg taggggacgt gagcgcgtcg agatcgaccg gatcgagaa 11220
ttttcgagg aaagcgtcta gccaatcgca gtcgaaggt aagctcaaac acgtagcagc 11280
cctgcggacg ctgttagaat tgcggttgc gatgatgtaa tgaagtagg cgttttgag 11340
gcggcggtat gttgcgagga ggaccaggtc cttgggtcca gttgctgga tgcggagccg 11400
ctcggccatg cccagggcct ggccctgaca ccggctcagg ttctttagt agtcatgcat 11460
gagccttca atgtcatcac tggtgagggc ggagtcttc atgcgggtga ccccgacgcc 11520
cctgagcggc tgcacgagcg ccaggtcggc gacgacgcgc tcggcgagga tggcctgtt 11580
cacgcgggtg aggggtcctt ggaagtcgtc catgtcgacg aagcgggtat agggcccggt 11640
gttgatggtg taggtgcagt tggccatgag cgaccagttg acggtctgca ggccgtgctg 11700
cacgacctcg gactacctga gccgcgagaa ggcgcgcgag tcgaagacgt agtcgttga 11760
ggtgcgcacg aggtactggt atccgactag gaagtgcggc ggcggtggtg gtagagcgg 11820
ccagcgctgg gtggccggcg cggcggggc caggctctcg agcatgaggc ggtggtagcc 11880
gtagaggtag cgggacatcc aggtgatgcc ggcgcggtg gtggagggc gcgggaactc 11940
gcggacgcgg ttccagatgt tgcgcagcgg caggaaatag tccatggtcg gcacggtctg 12000
gccggtgaga cgcgcgcagt cattacgct ctagaggcaa aaacgaaagc ggttgagcgg 12060
gctcttctc ctagacctgg cggaacgcaa acgggttagg ccgctgtgt accccggttc 12120
gagtccttc gaatcaggct ggagccgca ctaacgtggt attggcactc ccgtctgac 12180
ccgagcccg tagccgccag gatacggcgg agagccctt ttgctggccg aggggggtcg 12240
ctagacttga aagcgaccga aaacctgcc gggtagtggc tcgcgcccgt agtctggaga 12300
agcatcgca ggttgagtc gcggcagaac ccggttcgag gacggccgc gcgagcggga 12360
cttggtcacc ccgcgatat aaagaccac agccagccga cttctccagt tacgggagcg 12420
agccccctt ttcttttg ccagatgcat cccgtcctgc gccaatgag tcccacccc 12480
ccggcgacca ccgcgaccgc ggccgtagca ggcgccggcg ctagccagcc accacagaca 12540
gagatggact tgaagaggg cgaagggctg gcaagactgg gggcgccgtc cccggagcga 12600
catcccccg tgcagctgca gaaggacgt cgcccggt acgtgcctac gcagaacctg 12660
ttcagggacc gcagcgggga ggagcccgag gagatgcgcg actgccgtt tcggcgggc 12720
agggagctgc gcgagggcct ggaccgccag cgcgtgctgc gcgacgagga ttcgagccg 12780
aacgagcaga cggggatcag cccgcacgc gcgcacgtgg cggcagcaa cctggtgacg 12840
gcctacgagc agacggtgaa gcaggagcgc aacttcaaa agagtttcaa caaccacgtg 12900
cgcacctga tcgcgcgca ggaggtggcc ctgggcctga tgcacctgt ggacctggcg 12960
gaggccatc tgcagaacc ggacagcaag cctctgacgg cgcagctgt cctggtggtg 13020
cagcacagca gggacaacga ggcttcagg gaggcgtgc tgaacatgc cgagcccgag 13080
ggtcgtggc tgctggagct gattaacatc ttgcagagca tcgtagtga ggagcgcagc 13140
ctgagcctgg ccgagaaggt ggcggcgatc aactactcg tgctgagcct gggcaagtt 13200
tacgcgcgca agatttaca gacgccgtac gtgccatag acaaggaggt gaagatagac 13260
agcttttaca tgcgcatggc gctcaagggt ctgacgtga gcgacgacct gggcgtgtac 13320
cgcaacgacc gcatccaaa ggccgtgagc acgagccggc ggcgcgagct aagcgaccgc 13380
gagctgatgc ttagtctcgc ccggcgctg gtagggggcg ccggcgccg cgaggagtcc 13440
tacttcgaca tgggtgcgga cctgcattgg cagccgagcc ggcgcgctt ggaggccgcc 13500
tacggtcag aggacttga tgaggagag gaagaggagg aggatgcacc cgctgcgggg 13560
tactgacgcc tccgtgatgt gtttttagat gtcccagca gcccggacc ccgccataag 13620
ggcgcgctg caaagccagc cgtccggtct agcatcgac gactgggagg ccgcatgca 13680

acgcatcatg gccctgacga cccgcaaccc cgagtccttt agacaacagc cgcaggccaa 13740
cagactctcg gccattctgg aggcggtggt cccctctcg accaaccaca cgcacgagaa 13800
ggtgctggcg atcgtgaacg cgtggcgga gaacaaggcc atccgtcccg acgaggccgg 13860
gctggtgtac aacgcctgc tggagcgct gggccgctac aacagcacga acgtgcagtc 13920
caacctggat cggctggtga cggacgtgcg cgaggccgtg gcgcagcgcg agcggttcaa 13980
gaacgagggc ctgggctcgc tgggtggcgt gaacgccttc ctggcaacgc agccggcgaa 14040
cgtgccgcgc gggcaggacg attacacaa ctttatcagc gcgtgcggc tgatggtgac 14100
cgaggtccc cagagcgagg tgtaccagtc tggcccggac tacttttcc agacgagccg 14160
gcagggcttg cagacggtga acctgagcca ggcttcaag aatctgcgcg ggctgtgggg 14220
cgtgcaggcg cccgtggggc accggtcaac ggtgagcagc ttgctgacgc ccaactcgcg 14280
gctgtgctg ctgctgatcg cgcccttcac cgacagcggc agcgtgaacc gcaactcgta 14340
cctgggcat ctgctgacgc tgtaccgca ggccataggc caggcgcagg tggacgagca 14400
gacctccag gagatcacta gcgtgagccg cgcgctgggg cagaacgaca ccgacagtct 14460
gagggccacc ctgaactttt tctgaccaa tagacagcag aagatcccgg cgcagtacgc 14520
actgtcgcc gaggagggaa ggattctgag atatgtcag cagagcgtag ggctgttctt 14580
gatgcaggag ggtgccccc ccagcgccgc gctggacatg accgcgcgca acatggaacc 14640
tagcatgtac gccgcaacc ggccgttcat caataagctg atggactact tgcaccgcgc 14700
ggcggccatg aacacggact acttacaa cgccatctg aaccgcact ggctcccgc 14760
gccggggttc tacacggcg agtacgacat gccgacccc aacgacgggt tctgtggga 14820
cgactggac agcgcggtgt tctcgccgac ctttcaaaag cgccaggagg cgccgccgag 14880
cgaggcgcg gtggggagga gccccttcc tagcttaggg agttgcata gcttgcggg 14940
ctcggtgaac agcggcaggg tgagccggcc gcgcttctg ggcgaggacg agtacctgaa 15000
cgactcgtg ctgcagccgc cgcgggcaaa gaacgccatg gccaataacg ggatagagag 15060
tctggtggac aaactgaacc gctggaagac ctacgctcag gaccataggg acgcgcccgc 15120
gcccgggca cagcgccacg accggcagcg gggcctggtg tgggacgacg aggactcggc 15180
cgacgatagc agcgtgttg acttggcgcg gagcggtggg gtcaaccgt tcgcgcatct 15240
gcagccaaa ctggggcgac ggtgtttt aatgaaataa aactaccaa ggccatagcg 15300
tgcgttctt tcttgttag agatgaggcg cgcggtggtg tcttctctc ctctccctc 15360
gtacgagagc gtgatggcg aggcgacct ggaggttccg tttgtcctc cgcggtatat 15420
ggctctacg gagggcagaa acagcattcg ttactcgag ctggctccgc agtacgacac 15480
cactcgcgtg tacttgggtg acaacaagtc ggcggacatc gcttccctga actacaaaa 15540
cgaccacagc aacttctga ccacggtggt gcagaacaac gatttacc cgcggaggc 15600
cagcacgcag acgataaatt ttgacgagcg gtcgcggtgg ggcggtgatc tgaagacct 15660
tctgcacact aacatgccc atgtgaacga gtacatgtt accagcaagt ttaaggcgcg 15720
ggtgatggtg tctaggaagc atccagaggg ggtagtga acagattga gtcaggataa 15780
gcttgaatat gagtgtttg agttaccct gccgaggga aactttccg agaccatgac 15840
catagacctg atgaacaacg ccatcttga aaactactg caagtggggc ggcagaatgg 15900
cgtgtggag agcgatatcg gagtcaagtt tgacagcaga aattcaagc tgggctggga 15960
cccgtgacc aagctggtga tggcagggt ctacacctac gaggcctcc acccgagct 16020
ggtgctgctg ccgggctgcg ggtggtgact caccgagagc cgcctgagca acctctggg 16080
catcgcaag aagcaacct tcaagaggg ctccagaatc atgtatgagg atctagaagg 16140
tggcaacatc ccgcccctc ttgatgtcc caagtactg gaaagcaaga agaaagtga 16200
agacgaaact aaaaatgcag ctgcggccac agccgataca accactaggg gtgatacatt 16260
tgcaactcca gcgcaagaga cagcagctga taagaaggta gaagtctgc ccattgaaa 16320
ggatgagagt gtagaagtt acaacctgat ccaggggacc cagcacgcg tgtaccgag 16380
ttggtacctg tctatactt acggggacc cagagaaggg gtgcagtcgt ggacgtgct 16440
caccaccccg gacgtacct gcggcgcgga gcaagtctac tggctactgc cggacctcat 16500
gcaagacccc gtcaccttc gtcaccca gcaagtcagc aactacccg tggcggcg 16560
cgagctcatg ccttccgcg ccaagagctt ttacaacgac ctgcctctt actcccagct 16620
catccgcagc tacacctccc tcaccacgt cttcaaccg tccccgaca accagatcct 16680
ctgcgccc cccgcgcca ccatcaccac cgtcagtga aacgtgctg ctctacaga 16740
tcacgggacg ctaccgctgc gcagcagtat ccgcgagtc cagcgagta ccgtactga 16800

cgcccgctgc cgcacctgtc cctacgtcta caaggccctg ggcatagtcg cgccgcgcgt 16860
gctttccagt cgcaccttct aaaaaaatgt ctatttcac ctcgccagc aataacaccg 16920
gctgggggtct tactagaccc agcaccatgt acggaggagc caagaagcgc tcccagcagc 16980
accccgctccg cgtccgcggc cacttccgcg ctccctgggg cgcttacaag cgccggcgga 17040
cttccaccgc cgtgcgcacc accgtcgacg acgtcatcga ctcggtggtc gccgacgcgc 17100
gcaactacac tccgcccccc tccaccgtgg acgcggtcat cgacagcgtg gtggccgacg 17160
cgcgcgacta tgccagacgc aagagccggc ggcgacggat cgccaggcgc caccggagca 17220
cgcccgccat gcgcgccgcg cgggctctgc tgcgccgcgc cagacgcacg ggccgccggg 17280
ccatgatgcg agccgcgcgc cgcgtgccca ctgcaccac ccccgaggc aggactcgca 17340
gacgagcggc cgccgccgcg gctgcggcca tctctagcat gaccagacc aggcgcggaa 17400
acgtgtactg ggtgcgcgac tccgtcacgg gcgtgcgcgt gcccgtcgc accgtcttc 17460
ctcgtccctg atctaagtct tgtgtctcc cccgcaagcg acgatgtcaa agcgcaaat 17520
caaggaggag atgtccagg tctcgcccc ggagatttac ggaccacccc aggcggacca 17580
gaaacccgc aaaatcaagc gggtaaaaa aaaggatgag gtggacgagg gggcagtaga 17640
gtttgtgcgc gacttcgtc cgcggcggcg cgtaaattgg aaggggcgca ggtgcagcg 17700
cgtgttcgg cccggcacgg cgggtggtgt cagccccgc gagcggctct cgtcaggag 17760
caagcgtagc tatgacgagg tttacggcga cgacgacatc ctggaccagg cggcgagcg 17820
ggcggcgagc ttcgctacg ggaagcggc gcgcgaagag gagctgatct cgtgccgct 17880
ggacgaaagc aacccacgc cgagcctgaa gcccgtagc ctgcagcagg tctgcccc 17940
ggcgggtgtc ctgccgagc gcgggggtcaa gcgcgagggc gagagcatgt acccgacat 18000
gcagatcatg gtgccaagc gccggcgcg gtgagacgtg ctggacaccg tgaatatga 18060
tgtggagccc gaggtcaagg tgcgccccat caagcaggtg gcgcggggc tggcggtgca 18120
aacgtggac attcagatcc ccaccgacat ggaatgcgac aaaaaaccct cgaccagcat 18180
cgaggtgcaa accgacccct ggctcccagc ctccaccgt accgttcca cttctaccgc 18240
cgccacggct accgagctc ccaggaggcg aagatggggc gccgccagcc ggctgatgcc 18300
caactacgtg ttgatcctt ccacatccc gacgccgggc taccgcgga cccggtacta 18360
cgccagccgc cggcgcccag ccagcaaacg ccgccgccgc accgccacc gccgccgtct 18420
ggccccgcc cgcgtgcgc gcgtgaccac gcgcggggc cgtcgtctg tctgcccac 18480
cgtgcgtac caccagca tctttaatt cgtgtgtgt gatactgtg cagagagatg 18540
gctctactt gccgcctgc catccccgc ccgaattacc gaggaagatc ccgccgagg 18600
agaggcatgg caggcagcg cctgaaccgc cgccggcggc gggccatgc caggcgctg 18660
agtggcggt tctgccccg gctatcccc ataagccg cgccattgg cacgatccc 18720
ggcatagctt ccgttgcgt gcaggcgtc cagcgccgt gatgtgcga taaagcctt 18780
ttagacttg acacacgtg tctgtatat tttagaatg gaagacatca atttgcgtc 18840
cctggtccg cggcacggca cgcggcgtt catgggcacc tggaaacgaga tggcaccag 18900
ccagctgaac ggggggcct tcaattggag cagtgtctg agcgggctta aaaatttcg 18960
ctcgacgtc cggacctatg ggaacaaggc ctggaatagt agcacggggc agttgttaag 19020
ggaaaagctc aaagacaaa attccagca gaaggtggtg gacgggctg cctcgggcat 19080
taacggggtg gtggacatc cgaaccaggc cgtgcagcgc gagataaaca gccgcctgga 19140
cccgcgccg cccacgtgg tggagatgga agatgcaact ctccgccgc ccaaaggcga 19200
aaagcggcg cggcccgac cgaggagac gatctgcag gtggacgagc cgccctcgt 19260
cgaggaggcc gtcaaggccg gcatgcccac cagcgcac atcgcgccgc tggccacggg 19320
tgtaatgaaa ccgccaccc ttgacctgc tccaccacc gcgccgctc caccgaaggc 19380
aactccggt gtgagggccc cccgggtggc gaccgccgt cgccgctcc ccgccgccg 19440
ccaggcccag aactggcaga gcacgtgca cagtatctg ggctgggag tgaagtct 19500
gaagcggcg cgtgctatt gagagagagg aaagaggaca cttaaaggag agcttaact 19560
gtatgtcct taccgcga gaacgcgcga agatggccac cccctcatg atgccgagt 19620
ggcggtacat gcacatgcc gggcaggac cctcgagta cctgagccc ggtctggtc 19680
agttgccc cgccaccgac acgtactca gcctgggcaa caagttagg aacccacgg 19740
tggccccgac ccacgatgt accacggacc ggtccagcg tctgacgtc cgttcgtgc 19800
ccgtggatc cgaggacac acgtactct acaaggcgc cttactctg gccgtggcg 19860
acaaccgggt gctagacat gccagcatt acttgacat ccgcggcgtc ctggaccgcg 19920

gtcccagctt caaacctac tcgggcacgg cctacaacag cctggctccc aagggtgccc 19980
ccaatcccag tcagtgggaa acaaaagaaa agcaaggaac tactggagga gtgcagcaag 20040
aaaaagatgt cacaaaaaca ttgtgtgtg ctgccaccgg cggaattaat ataacaaacc 20100
agggtctgtt actaggaact gacgaaaccg ctgagaatgg caaaaaagac atttatgcag 20160
acaagacttt ccagccagaa cctcaagttg gagaagaaaa ctggcaggaa aatgaagcct 20220
tctatggagg aagggtcttt aaaaaggaca ctaaatgaa accatgctat ggatctttt 20280
ctagacctac taatgagaaa ggaggtcagg caaagttcaa accagttaat gaaggagaac 20340
aacctaaaga tctggatata gattttgctt actttgacgt ccttggcgga agtcctccag 20400
caggtggtag tggggaagaa tacaagcag atataatgt gtacactgaa aatgttaac 20460
ttgaaacacc agacactcat gtggtttaca agccaggaac ttacagataac agttcagaaa 20520
tcaatctggt tcagcagtc atgccaacaa gaccaacta cattggcttt agggacaact 20580
ttgtaggtct catgtattac aacagcaccg gaaatatggg tgtgctggct ggtcaggctt 20640
ctcagttgaa cgctgtggtc gacttgcaag acagaaacac cgagtattct taccagctat 20700
tgctagattc tctgggtgac agaaccagat actttagcat gtggaactct gcggtggaca 20760
gttacgatac agatgtcagg atcattgaaa atcacggtgt ggaagatgaa ctccaaaact 20820
attgcttccc attgaatggc actggaacca attccactta tcaaggtgta aagattacaa 20880
atggtaatga tgggtctgaa gaaagtgagt gggagaaaaga cgatgcaatt tctagacaaa 20940
accaaatctg caagggcaat gtctacgcca tggagatcaa cctgcaggcc aacctgtgga 21000
agagttttct gtactegaac gtggccctgt acctgcccga ctctacaag tacacgccgg 21060
ccaacgtcaa gctgcccggc aacaccaaca cctacgagta catgaacggc cgcgtggtag 21120
ccccatcct ggtggacgcc tacatcaaca tcggcgcccg ctggtcgttg gacccatgg 21180
acaacgtcaa ccccttcaac caccaccgca atgcgggct gcgtaccgc tccatgtgc 21240
tgggcaacgg ccgctacgtg ccttccaca tccaagtcc caaaagttc ttgccaatca 21300
agaacctgct cctgctccc ggctcctaca cctacgagt gaacttcgc aaggacgtca 21360
acatgatcct gcagagttc ctcggcaacg acctgcgct cgacggcgcc tccgtccgt 21420
tcgacagcgt caacctatac gccactttct tccccatggc gcacaacacc gttcaacct 21480
tggagccat gctgcgcaac gacaccaacg accagtcct caacgactac ctctcgccg 21540
ccaacatgct ctacccatc ccggccaagg ccaacaacgt gccatctcc atccatcgc 21600
gcaactgggc cgcttcgc ggctggagt taccgggt caagaccaag gaaactcct 21660
ccctcggtc gggttcgac cctactttg tctactcgg ctccatccc tacctcgac 21720
ggacttcta cctcaaccac acctcaaga aggtctccat catgttcgac tctcgtgca 21780
gctggcccg caacgaccg ctgctcacgc cgaacgagt cgagatcaag cgcagcgtc 21840
acggggagg ctacaacgt gccaatgca acatgacaa ggactggtc ctctccaga 21900
tgcttccca ctacaacatc ggctaccagg gttccact gcccgaggc tacaaggac 21960
gcattgact ctcttcgc aacttcagc ccatgagcag gcaggtggtc gatgagatca 22020
actacaagga ctacaaggc gtcacctgc cttccagca caataactc ggcttcaccg 22080
gtacctgc accaccatg cgccaggggc agccctacc cgccaactc cctaccgc 22140
tcctggta gacagccgt cctccgtca ccagaaaaa gtctctgc gacagggtca 22200
tgtggcgcat ccattctc agcaactca tgcctatgg cgccctacc gacctgggtc 22260
agaacatgct ctacgccaac tcggccacg cgctcgacat gacctcgag gtggaccca 22320
tggatgacc caccctctc tatctctc tcgaagttt cgacgtggtc aggtacacc 22380
agccgcaccg cgcgctac gaggcgtct acctgcgac gccctctcc gccggcaacg 22440
ccaccaccta agcatgagc gctccagcga acgagagtc gcggccatc tgcgcgacct 22500
gggtgcggg cctactttt tgggaccca cgacaagcgc ttccgggt tctcgcgg 22560
cgacaagctg gcctgcgca tctcaaac ggccggcgc gagaccggag gcgtgcactg 22620
gtctgcctc ggctggaacc cgcgctcgc cactgctac atgttcgacc ctttgggt 22680
ctcgaccgc cggtcaagc agatttacag ctctgagta gaggcctgc tgcgcgcag 22740
cgccctggc tctcgcgg accgctgtc cagctcgag cagtcactc agaccgtgca 22800
ggggcccgac tccgcgcct gcggactct ctgttcgac ttctgcatg ccttcgtgca 22860
ctggccgac cgacctgag acggaaaccc caccatgaac ttgtgacgg ggtgcccc 22920
cggtatgcta caatgccac aggtgctgcc caccctcagg cgcaaccagg aggaactcta 22980
ccgtctctc gcgcgccact cccctactt tctctccc cgcgcgcca tgaacacgc 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, масс %:

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

6. Фармацевтическое средство по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для лиофилизированной формы содержит, масс %:

трис от 0,0180
до 0,0338

хлорид от 0,1044
натрия до 0,1957

сахароза от 5,4688
до 10,2539

магния от 0,0015
хлорида до 0,0028
гексагидрат

ЭДТА от 0,0003
до 0,0005

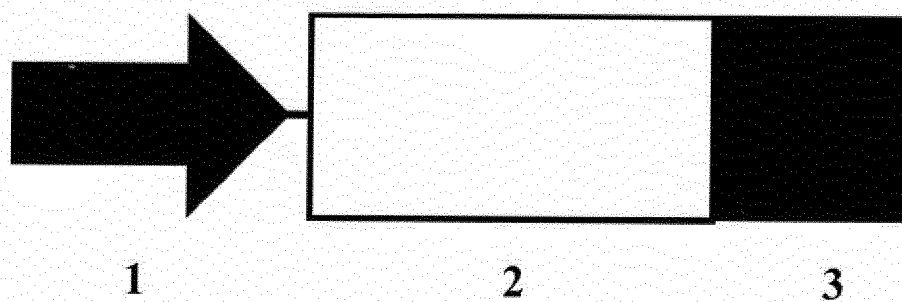
полисорбат-от 0,0037
80 до 0,0070

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.

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



Фиг. 1

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



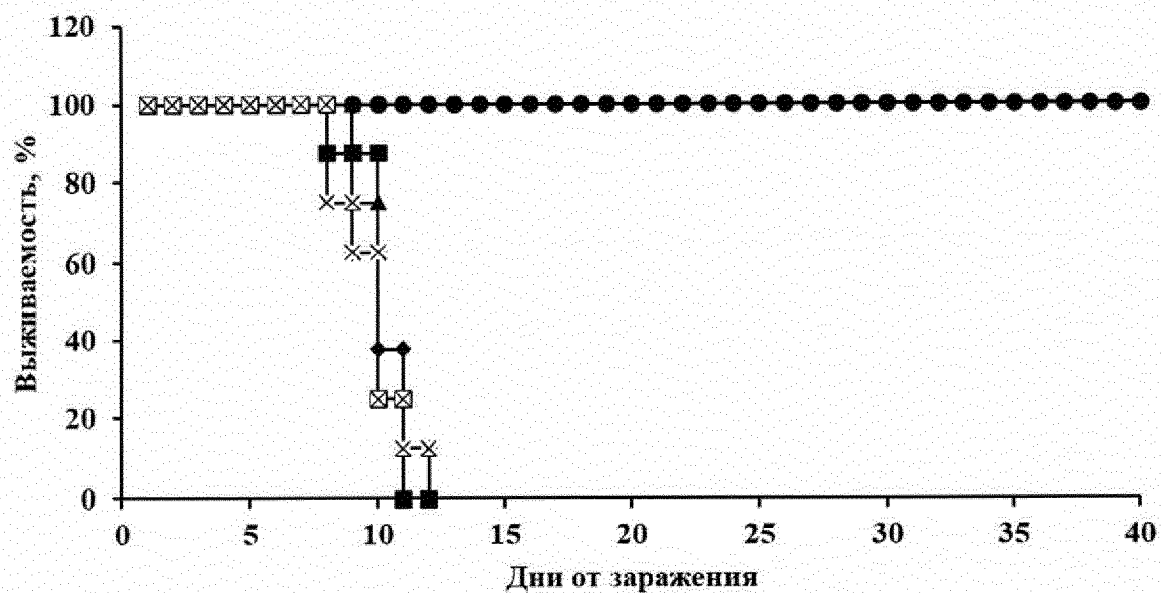
Фиг. 2

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



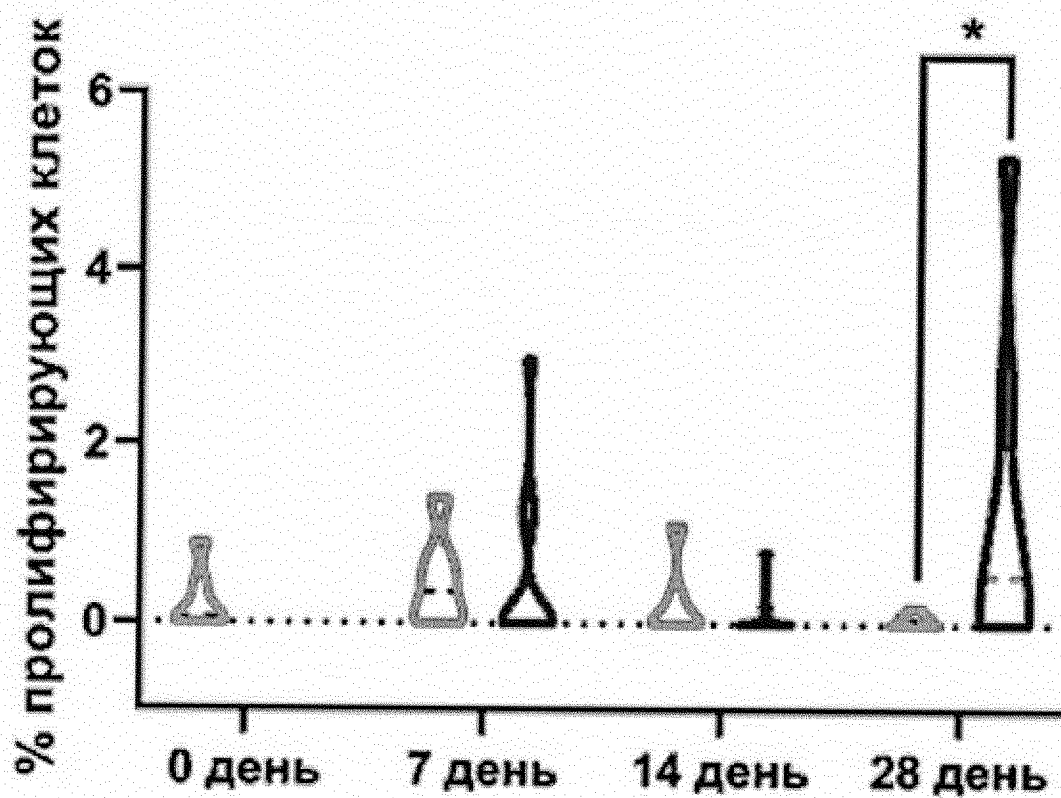
Фиг. 3

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



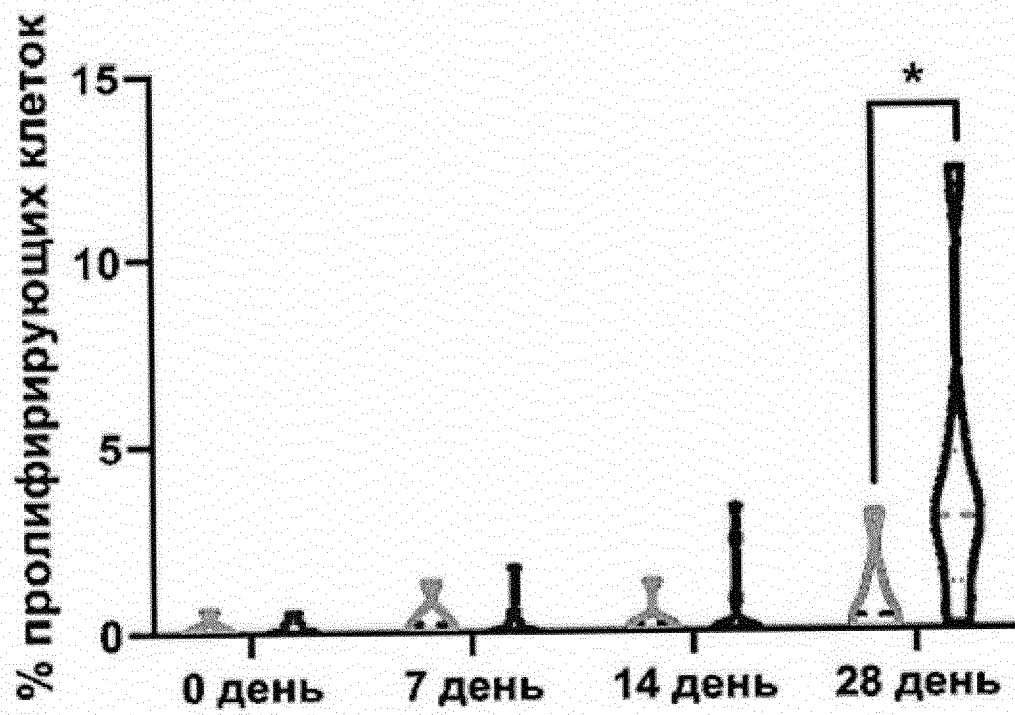
Фиг. 4

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



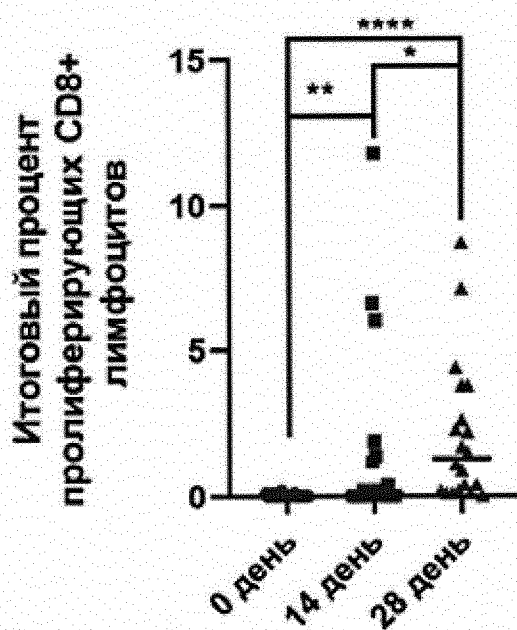
Фиг. 6

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



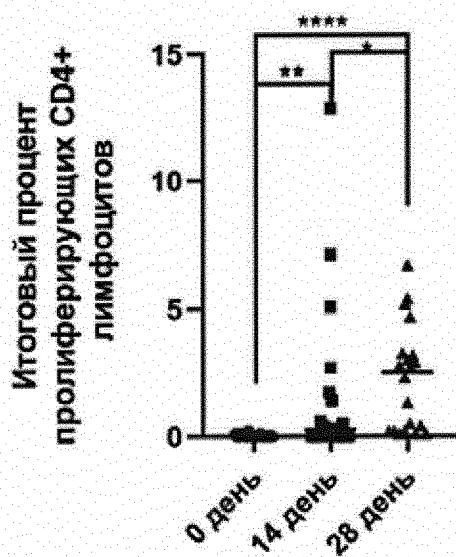
Фиг. 7

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



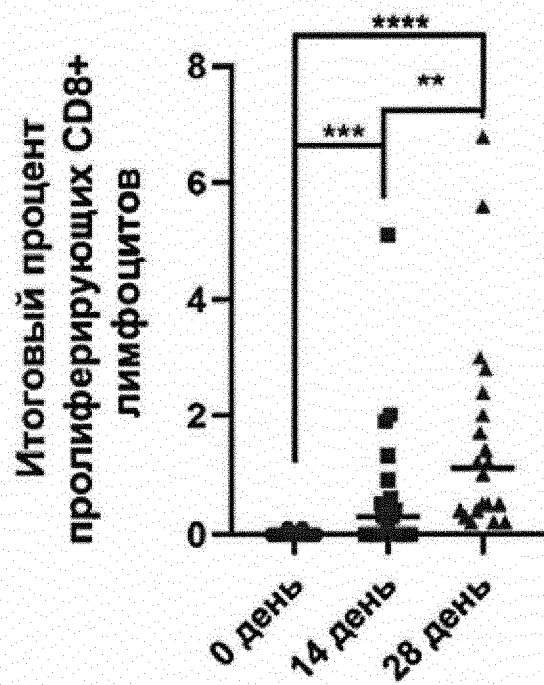
Фиг. 8

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



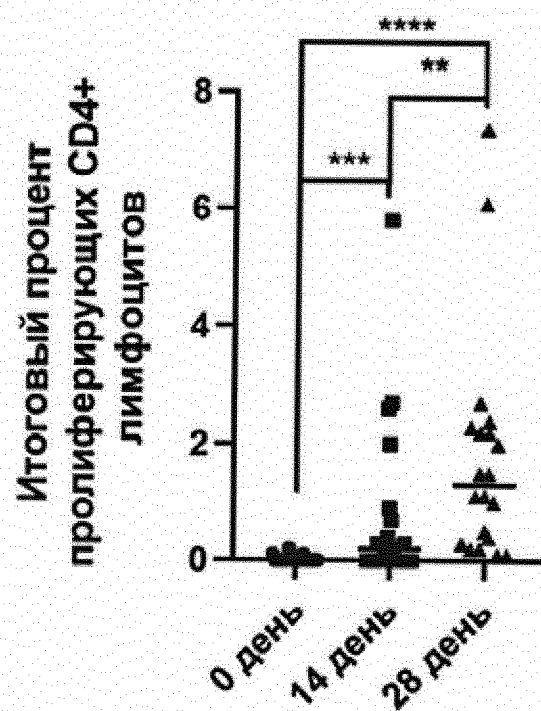
Фиг. 9

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



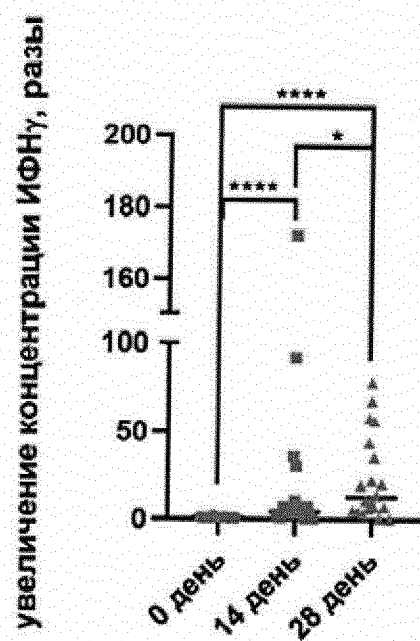
Фиг. 10

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



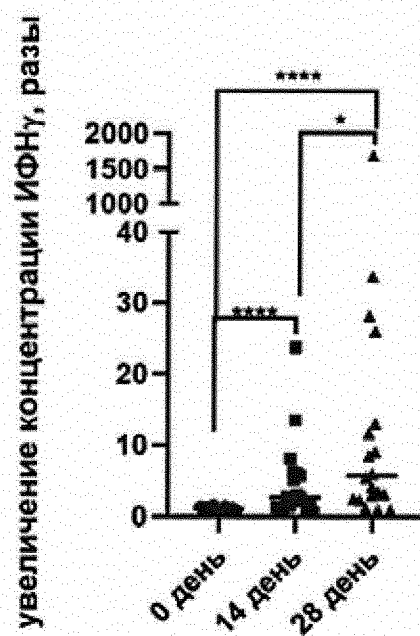
Фиг. 11

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

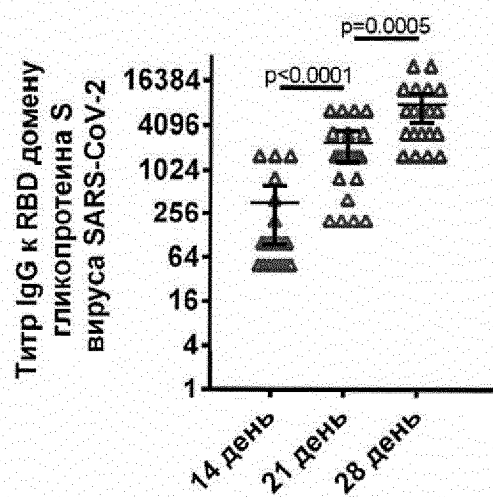


Фиг. 12

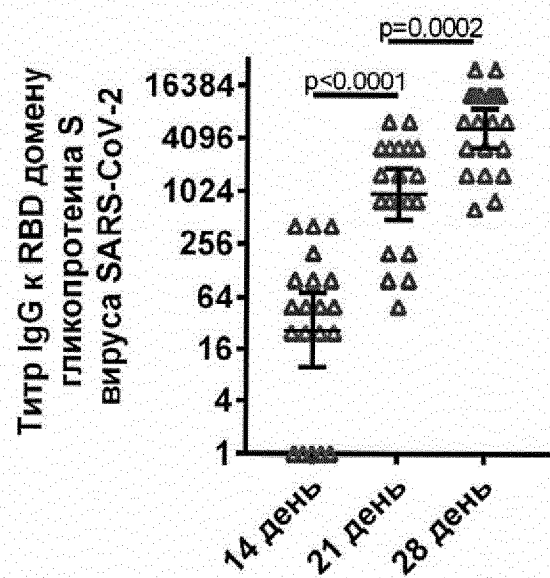
Фармацевтическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты).



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2020/000591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/215 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/215, A61P 31/14, C12N 7/00, 15/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 102050616 B1 (JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.) 03.12.2019	1-8
A	US 6251677 B1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 26.06.2001	1-8
A	WO 2000/012740 A2 (DUKE UNIVERSITY et al.) 09.03.2000	1-8
A	US 2019/0134178 A1 (ALTIMMUNE INC.) 09.05.2019	1-8
A	WO 2010/037027 A2 (AUBURN UNIVERSITY et al.) 01.04.2010	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2020 (16.12.2020)

Date of mailing of the international search report

16 December 2020 (16.12.2020)

Name and mailing address of the ISA/RU:
Federal Institute of Industrial Property,
Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59,
GSP-3, Russia, 125993
Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37

Authorized officer

E. Smirnova

Telephone No. 8(495)531-64-81